

Iratxe Viteri Agustin

Influencia de la presión de compactación durante la colocación del injerto óseo particulado en la angiogénesis y en la neoformación ósea en los procedimientos de regeneración ósea guiada

Director/es

Lou Bonafonte, José Manuel  
Brizuela Velasco, Aritza

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

INFLUENCIA DE LA PRESIÓN DE COMPACTACIÓN  
DURANTE LA COLOCACIÓN DEL INJERTO ÓSEO  
PARTICULADO EN LA ANGIOGÉNESIS Y EN LA  
NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS  
PROCEDIMIENTOS DE REGENERACIÓN ÓSEA  
GUIADA

Autor

Iratxe Viteri Agustin

Director/es

Lou Bonafonte, José Manuel  
Brizuela Velasco, Aritza

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

2022





**Universidad**  
**Zaragoza**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FISIOLOGÍA Y MEDICINA  
LEGAL Y FORENSE

FACULTAD DE MEDICINA

**TESIS DOCTORAL**

**Influencia de la presión de compactación durante la  
colocación del injerto óseo particulado en la  
angiogénesis y en la neoformación ósea en los  
procedimientos de regeneración ósea guiada.**

Autora:  
**Iratxe Viteri Agustín**

Directores:  
**José Manuel Lou Bonafonte**  
**Aritza Brizuela Velasco**

Zaragoza, Noviembre 2021





**Universidad**  
**Zaragoza**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FISIOLOGÍA Y MEDICINA  
LEGAL Y FORENSE

FACULTAD DE MEDICINA

**TESIS DOCTORAL**

**Influencia de la presión de compactación durante la  
colocación del injerto óseo particulado en la  
angiogénesis y en la neoformación ósea en los  
procedimientos de regeneración ósea guiada.**

Autora:

**Iratxe Viteri Agustín**

Directores:

**José Manuel Lou Bonafonte**  
**Aritza Brizuela Velasco**

Zaragoza, Noviembre 2021



*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”*

*Albert Einstein*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar querría agradecer al Dr. Aritza Brizuela Velasco, Profesor Colaborador de Honor del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas de la Universidad de Oviedo, no sólo el haber dirigido esta tesis doctoral sino el hecho de confiar en mí, el haber visto en mí la capacidad de hacerlo, animarme y guiarme en este camino, sin su ayuda este trabajo no habría sido posible.

Al Dr. Jose Manuel Lou Bonafonte, Profesor Titular del Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense de la Universidad de Zaragoza, por su ayuda inestimable durante la dirección de esta tesis doctoral, por confiar en mí, por enseñarme otras perspectivas de la investigación, por resolver mis dudas y apoyarme incondicionalmente en esta etapa.

Al grupo de investigación “Fundación Osteosite”, un grupo lleno de ilusión y grandes proyectos donde comencé mi camino en la investigación, por confiar en mí y enseñarme a disfrutar de esta pasión, sacar siempre el lado positivo de las cosas y compartir muy buenos momentos mientras trabajamos.

A los Doctores Fernando Unda (Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco) y Ricardo Andrade (Servicio general de Microscopía Analítica y de alta resolución en Biomedicina de Universidad del País Vasco) por su ayuda en la toma de imágenes con diferentes técnicas microscópicas y a la Doctora Lorena Benito Garzón (Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca) junto con el equipo del Departamento de Anatomía e Histología Humana de la Universidad de Salamanca por su ayuda durante el tratamiento de las muestras histológicas.

Al Doctor Reinhard Gruber y su grupo de investigación en Biología Oral (Universidad Clínica de Odontología de Viena) por su inestimable ayuda en la valoración, análisis y forma de presentación de los datos obtenidos en el estudio in vivo.

A Klockner S.A. (Barcelona, España), Botiss Biomaterials GmbH (Zossen, Alemania) y a Soadco S.L. (Escaldes-Engordany, Andorra) por confiar en el proyecto y proporcionarme los materiales.

A mis amigos, esos que siempre están ahí apoyándome y animándome a continuar.

A mi familia que me ha enseñado que lo que vale la pena requiere un esfuerzo y me ha apoyado siempre en todos mis proyectos ayudándome a conseguir mis metas.

A Hermo, por confiar en mí, por hacerme creer que puedo con todo y animarme a conseguirlo y por su apoyo incondicional.

Y a todas aquellas personas que, aún quizá sin saberlo, han contribuido a que este proyecto se haga realidad.





# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	Pág. 17
1.1 Antecedentes y estado actual del tema.....	Pág. 19
1.2 Tejido óseo.....	Pág. 24
1.2.1 Composición .....	Pág. 24
1.2.2 Formación ósea .....	Pág. 33
1.2.3 Tipos de hueso y organización estructural .....	Pág. 36
1.2.4 Envolturas óseas .....	Pág. 39
1.2.5 Funciones .....	Pág. 40
1.2.6 Mecanismos necesarios para el adecuado funcionamiento y mantenimiento óseo .....	Pág. 41
1.3 Cicatrización ósea.....	Pág. 54
1.3.1 Cicatrización alveolar tras la extracción dental .....	Pág. 57
1.4 Regeneración ósea guiada.....	Pág. 65
1.4.1 Desarrollo del concepto de la ROG .....	Pág. 66
1.4.2 Mecanismos fisiológicos implicados .....	Pág. 69
1.4.3 Materiales para la regeneración ósea guiada.....	Pág. 71
1.4.4 Repuesta del huésped a los materiales de injerto .....	Pág. 91
1.5 Importancia de la vascularización en la regeneración ósea .....	Pág. 94
1.5.1 Vascularización en la ROG .....	Pág. 95
1.6 Influencia de la técnica quirúrgica en los resultados de ROG .....	Pág. 99
2 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....	Pág. 107
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág. 113
3.1 Estudio para la determinación del rango clínico de presión de compactación del material de injerto.....	Pág. 116
3.2 Diseño y fabricación de un instrumento para la compactación del biomaterial.....	Pág. 117
3.3 Desarrollo de un contenedor quirúrgico cilíndrico que acote el defecto óseo.....	Pág. 119

3.4	Determinación in vitro del efecto de la compresión del material mediante técnicas de Microscopía y Micro-tomografía Computerizada (Micro-CT).....	Pág. 121
3.4.1	Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microscopía óptica.....	Pág. 121
3.4.2	Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM).....	Pág. 122
3.4.3	Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microtomografía computerizada de alta resolución (micro-CT). ....	Pág. 124
3.5	Estudio piloto sobre un animal de experimentación.....	Pág. 128
3.6	Estudio principal sobre los animales de experimentación.....	Pág. 129
3.6.1	Animales de experimentación .....	Pág. 129
3.6.2	Anestesia.....	Pág. 130
3.6.3	Protocolo quirúrgico .....	Pág. 131
3.6.4	Eutanasia, preparación de los especímenes y análisis histomorfométrico .....	Pág. 139
3.6.5	Análisis estadístico .....	Pág. 145
4	RESULTADOS .....	Pág. 147
4.1	Estudio para la determinación del rango clínico de presión de compactación del material de injerto.....	Pág. 149
4.2	Diseño y fabricación de un instrumento para la compactación del biomaterial.....	Pág. 150
4.3	Desarrollo de un contenedor quirúrgico cilíndrico que acote el defecto óseo.....	Pág. 155
4.4	Determinación in vitro del efecto de la compresión del material mediante técnicas de Microscopía y Micro-tomografía Computerizada (Micro-CT).....	Pág. 156
4.4.1	Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microscopía óptica.....	Pág. 156

4.4.2	Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM). .....	Pág. 157
4.4.3	Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microtomografía computerizada de alta resolución (micro-CT). .....	Pág. 160
4.5	Estudio piloto sobre un animal de experimentación. ....	Pág. 168
4.6	Estudio principal sobre los animales de experimentación. ....	Pág. 171
4.6.1	Resultados sobre el procedimiento quirúrgico.....	Pág. 171
4.6.2	Resultados sobre el análisis histológico.....	Pág. 171
5	DISCUSIÓN .....	Pág. 191
5.1	Discusión sobre la metodología empleada.....	Pág. 195
5.1.1	Sobre la idoneidad y diseño del modelo experimental .....	Pág. 195
5.1.2	Sobre las variables dependientes analizadas .....	Pág. 203
5.2	Discusión sobre los resultados obtenidos .....	Pág. 208
5.3	Relevancia de los resultados obtenidos.....	Pág. 217
5.4	Limitaciones del presente estudio .....	Pág. 219
5.5	Líneas de investigación futuras.....	Pág. 221
6	CONCLUSIONES .....	Pág. 225
7	BIBLIOGRAFÍA .....	Pág. 229
8	ABREVIATURAS.....	Pág. 265
9	ANEXOS .....	Pág. 271
9.1	Informe de calibración por empresa independiente. ....	Pág. 273
9.2	Informe del comité de ética.....	Pág. 283
9.3	Aprobación de proyecto por la junta de Extremadura. ....	Pág. 287
9.4	Indicios de calidad de la tesis.....	Pág. 291
9.4.1	Publicación de artículo: Revista “DYNA”. .....	Pág. 293
9.4.2	Presentación de Poster Científico: International Osteology Symposium .....	Pág. 307

9.4.3	Presentación Comunicación Oral: V International SCOI Congress .....	Pág. 311
9.4.4	Presentación Poster Científico: V International SCOI Congress .....	Pág. 315
9.4.5	Publicación de Artículo: Revista “International Journal of Oral and Maxillofacial Implants” .....	Pág. 319





# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.

El hueso en los vertebrados en general y en el ser humano en particular, es un tejido de origen mesodérmico que cumple diversas funciones esenciales, entre las que encontramos el sostén de las partes blandas del cuerpo, la locomoción (sirven como lugar de inserción de los músculos), la protección de órganos vitales, el desempeño de ciertas funciones metabólicas y sistémicas, etc.

En el caso concreto de los huesos maxilares, otra función importante que desempeñan es la de dar soporte y sostén a los dientes para la masticación. Los dientes de los vertebrados son estructuras derivadas del esqueleto dérmico que aparecieron con la formación de las mandíbulas, en los gnátostomados, permitiendo una mejora adaptativa en su función alimenticia, lo que posibilitó el aumento de tamaño de los vertebrados en general. (1) En efecto, la presencia de dientes ha permitido sin duda una mejora en la nutrición de las diferentes especies. Los dientes se han especializado de diversas maneras, en función tanto de los métodos de procesamiento del alimento como de otras adaptaciones no alimentarias. A pesar de la reducción del tamaño y la forma de los dientes de las poblaciones humanas modernas, debido a la adaptación y evolución, siguen constituyendo estructuras fundamentales para una correcta masticación.

El aumento en la esperanza de vida, se relaciona con un envejecimiento de la población y a su vez la edad avanzada se relaciona con la pérdida dentaria, de manera que el edentulismo parcial o total es muy común hoy en día y puede ocurrir como resultado de enfermedad (dental o periodontal) y/o trauma. Es una condición debilitante crónica que afecta a la capacidad de función masticatoria y fonatoria de millones de personas y no sólo provoca una afectación física sino también psicológica (2,3). Además, puede conllevar deficiencias nutricionales, dolor en el área orofacial y pobre funcionamiento psicosocial (4).

Las estadísticas que se proveen desde la Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales muestran que el 69% de los adultos de edades entre 35 y 44 años han perdido al menos un diente permanente a causa de un accidente, enfermedad de encías, un tratamiento endodóntico fallido o caries. Además, a la edad de 74 años, el 26% de los adultos han perdido todos sus dientes permanentes (5). Teniendo en consideración lo anterior y teniendo en cuenta el progresivo envejecimiento de la Población, se prevé que el edentulismo contará con una incidencia mayor en las próximas décadas (2,6).

Se ha descrito que el rendimiento masticatorio de las personas totalmente edéntulas que usan dentaduras completas es de menos del 20% comparada con las que tienen una dentición natural (6), por lo que desarrollar una estrategia para tratar a la población edéntula es esencial.

Uno de los avances más importantes en la odontología ocurrió en 1952, cuando un cirujano ortopédico Sueco llamado Per-Ingvar Branemark descubrió que el hueso podía crecer en la proximidad del Titanio (Ti) y se podía adherir al metal sin ser rechazado. Branemark (1983) lo llamo “oseointegración” (unión directa estructural entre el hueso y el implante cargado funcionalmente) y es la base biológica del éxito de los implantes modernos.

Los implantes dentales han revolucionado la odontología restauradora y sin duda han proporcionado beneficios para el cuidado del paciente (7). El implante dental se define como aquel dispositivo aloplástico que es quirúrgicamente colocado en el hueso alveolar residual del maxilar o la mandíbula y cuyos pilares emergen a través de los tejidos de la mucosa oral para dar soporte o retención a las prótesis dentales (8).

Inicialmente fueron introducidos para las personas que habían perdido todos sus dientes y tenían grandes dificultades en tolerar las dentaduras (3). Las prótesis implantoreténidas, ya fueran sobredentaduras completas (prótesis removibles implantoreténidas y mucosoportadas) o prótesis híbridas (prótesis fijas implantoreténidas), mejoran significativamente la calidad de vida de estos pacientes (6).

En las últimas décadas, con una población mundial en aumento, un aumento significativo en el número de ciudadanos de clase media con capacidad de gasto y un aumento significativo de la exigencia estética; la rehabilitación de las áreas parcial o totalmente edéntulas mediante implantes dentales (rehabilitados con coronas fijas implantoreténidas unitarias o múltiples o mediante sobredentaduras removibles) se ha convertido en una práctica común (9,10), demostrando obtener resultados altamente predecibles, con tasas de supervivencia y éxito de los implantes del 96% y 94,3% respectivamente (9,11). De hecho, la *Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración (SEPA)* ha estimado que cada año se colocan sólo en nuestro país entre 400.000 y 500.000 implantes dentales, datos que colocan a nuestro país entre los países europeos donde más implantes dentales se colocan.

A pesar de los avances tecnológicos, la disponibilidad de hueso es todavía el principal prerrequisito para una colocación de implantes segura y predecible, así como para alcanzar unos resultados funcionales y estéticos adecuados (10,12).

Sin embargo, una cresta alveolar residual adecuada en volumen es poco frecuente, debido no sólo a infecciones agudas/crónicas o como consecuencia de periodontitis severa, sino también como consecuencia de la pérdida de función mecánica tras la extracción o pérdida dental (12). La reabsorción del proceso alveolar frecuentemente provoca defectos estéticos y resulta un obstáculo importante para lograr una rehabilitación oral satisfactoria con implantes dentales (13,14), por tanto los procedimientos de aumento óseo suelen estar indicados, bien concomitantes con la colocación del implante o en intervenciones independientes (10). Se estima que alrededor del 50% de los lechos de implantes precisan un procedimiento que genere suficiente volumen óseo para la colocación del implante dental (15).

El proceso de regeneración ósea es complejo y es un tema de intenso enfoque de investigación (10). Se han descrito varias técnicas para aumentar el volumen óseo como son: la regeneración ósea guiada (ROG), la distracción osteogénica, los injertos en bloque y la expansión de cresta (16–18).

Concretamente, la formación de nuevo hueso en defectos óseos maxilares mediante regeneración ósea guiada (ROG) está bien documentada y ha mostrado obtener altas tasas de éxito. Se basa en el concepto de exclusión celular en el que se emplean membranas que aíslan el defecto óseo de otros tejidos, creando una zona en la que se evitará la progresión de tejidos no deseados (especialmente tejido blando) para ser repoblada por tejido óseo. (19–21)

La membrana barrera crea por tanto, un espacio aislado que permite que el hueso utilice su gran capacidad de cicatrización natural sin trastornos y de forma protegida (osteopromoción). En los estudios experimentales y clínicos se ha utilizado una amplia variedad de materiales de membrana para lograr la ROG, entre ellos los más empleados son el politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) y el colágeno. En los defectos óseos se colocan frecuentemente injertos óseos particulados que promoverán la formación ósea (el material de injerto funciona por tanto como un andamiaje para las células invasoras del huésped) y mantendrán el volumen a regenerar, evitando el colapso de la membrana. (22)

Los injertos óseos se dividen según su origen en: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y materiales de origen sintético o injertos aloplásticos; para los cuales se han descrito diferentes propiedades de osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis que influirán en los resultados clínicos. Además se pueden presentar en forma de partículas, bloques o pastas.

Para una adecuada formación ósea durante la ROG es importante cumplir con una serie

de requisitos, entre los que se destacan: una adecuada vascularización de la zona (el desarrollo del nuevo hueso depende de la creación de nuevos vasos sanguíneos que provean de células progenitoras y nutrientes a la zona de la regeneración), lograr una correcta estabilidad de la herida, mantener el espacio a regenerar y conseguir el cierre primario de la herida (23). Gracias al amplio desarrollo de esta técnica y de los materiales utilizados en ella, los tratamientos son cada vez más predecibles permitiéndonos tratar defectos cada vez más complejos.

El éxito o fracaso de estos procedimientos depende en definitiva de la eficiencia de la membrana barrera, del mantenimiento del espacio y de una correcta técnica quirúrgica. En varias revisiones sistemáticas se ha documentado que las tasas de la supervivencia y éxito de los implantes colocados parcial o totalmente en hueso regenerado (siempre y cuando la regeneración haya resultado correcta) fueron similares a las encontradas para los implantes colocados de forma convencional en hueso nativo, en el que no ha sido necesaria la regeneración ósea, siendo esta tasa de supervivencia superior al 90%. (9,11,24–27)

En general se considera que la vascularización de los biomateriales empleados durante la ROG es un factor determinante en el éxito de la regeneración ósea de defectos de tamaño crítico (28), y sin embargo se suele prestar poca atención a la influencia del método de colocación de los mismos en los resultados en cuanto a angiogénesis y neoformación ósea. A día de hoy, la compactación de estos biomateriales durante la cirugía se lleva a cabo con diferentes compactadores manuales empleando una fuerza de compactación según la sensación subjetiva de cada cirujano, sin saber la presión que se aplica sobre el biomaterial.

A este respecto, ciertos autores recomiendan no sobrecondensar el injerto a la hora de colocarlo en el defecto óseo, de manera que se permita el mantenimiento de los poros (inter e intrapartícula) y por tanto el espacio para la angiogénesis y la aposición celular (22,29–31), mientras que otros clínicos recomiendan un empaquetamiento más firme con objeto de asegurar una mejora en la estabilidad mecánica del injerto y conseguir una mayor área de biomaterial para la aposición celular (32,33). Sin embargo, existe una ausencia de evidencia científica sobre los efectos de las diferentes fuerzas de compresión en los resultados de la angiogénesis y la regeneración ósea de las zonas injertadas (34).

Cuando los diferentes estudios recomiendan sobrecondensar o, por el contrario, realizar una presión suave sobre los injertos particulados, por lo general no indican qué valor de presión es el límite que define una u otra técnica y se basan exclusivamente en criterios subjetivos. Consecuentemente, tampoco aportan información exacta que pueda trasladarse a la

---

investigación, a efecto de poder sumar evidencia por la vía de experimentos repetibles y reproducibles. Por este motivo surge la justificación de este trabajo de investigación, que pretende aportar información sobre los resultados de diferentes presiones sobre el material particulado en técnicas de ROG, estableciendo un instrumental y método específico para su estandarización.

## 1.2. TEJIDO ÓSEO.

El hueso es un tejido conectivo altamente especializado que constituye el órgano de sostén de los vertebrados. Está formado por componentes orgánicos e inorgánicos, en el que destacan por un lado las células y por el otro la matriz extracelular (35) que es la parte responsable de aportar al hueso las características biomecánicas necesarias para desempeñar su función estructural. De manera general, las propiedades biomecánicas del hueso van a depender de su contenido acuoso, de la porosidad (densidad) y del contenido mineral (36). Específicamente, la rigidez y la dureza del tejido óseo están determinadas por la presencia de sus constituyentes inorgánicos o minerales, en tanto que los componentes orgánicos y el agua le confieren un cierto grado de elasticidad y resistencia a las fracturas (35). Además, el hueso es un tejido muy sensible a las presiones, actuando las fuerzas tensionales como estímulo para su formación (35).

Más allá de su función de sostén desempeña un papel fundamental en la protección de ciertas estructuras vitales, regula la homeostasia de ciertos minerales, desempeña un papel fundamental en la hematopoyesis y sirve como reservorio para los factores de crecimiento y citoquinas (15,37).

Se trata de un órgano dinámico que sufre un recambio notable de sustancias, está muy bien irrigado y se remodela de forma continua. No en vano, es el único tejido del ser humano adulto que es capaz de regenerarse “ad integrum” (38,39).

### 1.2.1. Composición

El tejido óseo contiene aproximadamente un 65% de sustancias minerales y un 35% de matriz orgánica, células y agua (Tabla 1) (35,37,40). La matriz orgánica del hueso está formada por proteínas colágenas y no colágenas y es la base sobre la que se depositan iones de calcio y de fosfato, formando cristales de hidroxapatita (HA).

Las células funcionan de forma coordinada durante la formación, mantenimiento y remodelado del tejido óseo. Entre los componentes celulares se encuentran:

- Células osteoprogenitoras
- Osteoblastos (OBs)
- Osteocitos

- Células de revestimiento
- Osteoclastos (OCs)

Los OBs, OCs y las células de revestimiento se hallan en la superficie del tejido óseo, mientras que los osteocitos están embebidos en el interior de la matriz extracelular del hueso. (38)

### 1.2.1.1. Matriz orgánica

La matriz orgánica representa un tercio del peso óseo (35). Se sintetiza por los OBs (15,37) y está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%) (35,37,38,40). Esta matriz constituye el almacén para la precipitación de los cristales de fosfato cálcico y además actúa como medio de unión a superficies libres (línea de reabsorción ósea, biomateriales,...).

#### - Colágeno

El 90% de la matriz extracelular (EMC) está constituida por **colágeno**, en mayor medida tipo I (>95%) y en menor cantidad tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia de pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y de tipo XII, que se forma bajo estrés mecánico (38). En la molécula de colágeno se halla la secuencia de aminoácidos Arginina – Glicina – Aspartato (Arg-Gly-Asp), también denominado tripéptido RGD, que es reconocido por las integrinas de superficie de las células óseas (38,41). El colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral (38). El colágeno desempeña un papel estructural y morfogenético y aporta un entramado para el asentamiento de los cristales minerales (15).

#### - Sustancias no colágenas

El 10% restante de la matriz orgánica está constituido por **proteínas no colágenas** (35,37,40); de ellas las más características son las glicoproteínas, fosfoproteínas y proteoglicanos (35,38). También hay enzimas (colagenasas, etc.), productos extravasados de la sangre y factores de crecimiento que tienen parte de su reservorio en la matriz ósea (35,38). Las funciones de estas proteínas no colágenas aún no están bien definidas (40), aunque se piensa que participan en la regulación del depósito del componente mineral del

hueso, del recambio óseo y de la actividad celular ósea. Las proteínas no colágenas a lo largo de la superficie de las fibras de colágeno ayudan a la propagación del mineral y la mineralización completa de la matriz (37). De hecho es frecuente observar osteopontina y sialoproteína en focos de mineralización (15).

### **Glicoproteínas:**

- *Osteonectina*: es una glicoproteína específica del hueso sintetizada por los OBs que presenta gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la HA (35,38). Representa el 25% de las proteínas no colágenas del hueso, es necesaria para la mineralización normal y se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células (38). Al unirse a la fibra colágena y al cristal de HA proporcionan los núcleos de crecimiento de los cristales (35).

- *Fosfatasa alcalina*: es una enzima que libera fosfato inorgánico necesario para la mineralización a partir de ésteres fosfóricos, se considera un buen marcador de la actividad osteoblástica. (38)

- *Proteínas con el tripéptido RGD*: fundamentalmente son cinco; la osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración ósea, actuando como receptores de superficie de las células óseas, permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales metabólicas diversas. Contienen una secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (tripéptido RGD) que es reconocida por las integrinas de los OBs y los OCs ( $\alpha\beta3$ , entre otras). (38)

### **Proteoglicanos:**

Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. En la matriz osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos: ácido hialurónico, condroitinsulfato, biglicano y decorina (38). La función precisa de cada uno de los proteoglicanos se desconoce aún, pero parecen ser los encargados de favorecer y controlar el depósito de las sales de calcio (35).

**Fosfoproteínas:**

- *Osteocalcina*: es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los OBs y las plaquetas, dependiente de las vitaminas D, B y K (35,38). Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz, sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis (38). Se la considera una proteína de enlace del calcio al colágeno (35).

**Proteínas procedentes del plasma:**

Forman parte de la matriz orgánica ósea, más abundantes en proporción que en el plasma. Son la albúmina y la  $\alpha_2$ -SH-glicoproteína. Se considera que podrían estar relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide. (38)

**Factores de crecimiento:**

Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o bien procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células (38). Entre ellos se encuentran el factor de crecimiento tipo insulina, el factor de crecimiento fibroblástico, el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (15,35,38,40).

**1.2.1.2. Matriz inorgánica**

El componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato, mayoritariamente en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita (80%)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  localizados dentro o entre las fibras de colágeno. En menor proporción hay carbonato de calcio (15%), y otros elementos minoritarios como citrato, estroncio, magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. (35,38,40)

Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que diversos proteoglicanos, el magnesio, el ATP y el pirofosfato la inhiben (38).

Los cristales de apatita son más pequeños que los de otros tejidos calcificados como el esmalte y la dentina; se disponen en íntima relación con las fibrillas de colágeno, con su eje longitudinal paralelo a dichas fibras. (35)

La mineralización ocurre un tiempo después de la producción de la matriz extracelular. La capa de matriz que permanece no mineralizada se llama osteoide (~10  $\mu\text{m}$ ) (40). La mineralización extracelular ocurre en la unión del osteoide con el nuevo hueso formado a una determinada distancia del osteoblasto; esta región se conoce como “frente de mineralización” (15).

La mineralización del hueso comienza dentro de las fibras de colágeno, donde ocurre la nucleación mineral en forma de iones de calcio y fosfato que se depositan en intervalos regulares y finalmente forman los cristales de HA confiriendo rigidez a la malla de colágeno (37,40). El inicio de la nucleación mineral dentro del osteoide ocurre a los pocos días de su secreción; el primer mineral puede encontrarse en pequeños focos diferenciados que se acumulan en el frente de mineralización (15), pero la finalización y maduración a través de la propagación de cristales de HA se completa en el transcurso de varios meses (37).

La maduración de la matriz está asociada a la expresión de la fosfatasa alcalina y algunas otras de las proteínas no colágenas, como la osteocalcina y sialoproteína ósea. Se piensa que 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 HA formados. El tamaño y la distribución de los cristales minerales puede influir en las propiedades mecánicas del hueso. (37,40)

### **1.2.1.3. Células del hueso**

Tal y como se ha indicado, en el hueso encontramos las células que se presentan a continuación de las cuales describiremos brevemente algunas características.

#### Células osteoprogenitoras:

Las células osteoprogenitoras están presentes en la médula ósea, en el endostio y en el periostio que recubre la superficie interna y externa, respectivamente, de los huesos (42). Son

más activas durante la fase de crecimiento de los huesos y en los fenómenos de reparación de lesiones óseas. Pueden ser de dos tipos: los pre-osteoblastos y los pre-osteoclastos.

Los pre-osteoblastos son células fusiformes con abundante retículo endoplasmático rugoso (RER) y escaso aparato de Golgi (35). Proceden de células madre mesenquimáticas indiferenciadas y se localizan en el tejido conectivo que forma el periostio, el endostio y el tejido conectivo perivascular (35,40). Los reguladores más importantes de la diferenciación osteoblástica, a partir de células mesenquimales indiferenciadas son los genes pertenecientes a la familia Hedgehog, el factor de transcripción Cbfa1 y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (38,43).

Los pre-osteoclastos son células fusiformes multinucleadas con numerosas mitocondrias, ribosomas libres y un aparato de Golgi desarrollado (35), que proceden de los monocitos que a su vez provienen de las células madre hematopoyéticas (42).

#### Osteoblastos:

Son células cuboides muy voluminosas (20-30  $\mu\text{m}$ ), de núcleo ovoide grande y citoesqueleto muy desarrollado. Poseen todos los orgánulos relacionados con la síntesis proteica: complejo de Golgi muy desarrollado, RER muy extenso y las mitocondrias aparecen diseminadas por todo el citoplasma (15,35,38,40). Los OBs son células plenamente diferenciadas por lo que no tienen capacidad para migrar y reproducirse; para que pueda formarse hueso en un lugar determinado, las células progenitoras mesenquimáticas indiferenciadas (células osteoprogenitoras) deben migrar hacia ese sitio para proliferar y convertirse en OBs (42).

Los OBs son las células responsables de la síntesis, secreción y mineralización de la matriz ósea. La actividad de estas células aumenta cuando es necesaria la formación de nuevo hueso. Efectivamente, se trata de células polarizadas que segregan matriz osteoide unidireccionalmente hacia la superficie ósea (15) a un ritmo de 2-3  $\mu\text{m}$  por día y expresan fosfatasa alcalina, que permite la mineralización a un ritmo de 1-2  $\mu\text{m}$  por día (38). También median en la reabsorción llevada a cabo por los OCs (35,38,40,44), regulan el flujo de calcio y fosfato dentro y fuera del hueso (40), y sintetizan factores de crecimiento (38).

En las zonas con actividad osteogénica, los OBs se encuentran separados de la matriz ósea calcificada por una zona de matriz no mineralizada, denominada sustancia osteoide (35). En la superficie del osteoblasto que mira hacia la sustancia osteoide emergen gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas, que se extienden dentro de esta sustancia aun no mineralizada y

se conectan con las prolongaciones de los osteocitos y con OBs vecinos por medio de nexos o uniones comunicantes (proteínas transmembrana o integrinas), permitiendo el paso de mensajeros como el calcio, las citoquinas o las prostaglandinas (35,38).

Entre las propiedades de los OBs destaca la de poseer receptores para muchos mediadores de la fisiología ósea, como la paratohormona (35,40), la vitamina D (35,40), la proteína relacionada con la hormona paratiroidea, prostaglandinas, esteroides, algunas citoquinas, linfoquinas,... (40).

La vida media de los OBs humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células de revestimiento o en osteocitos (38,40). Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración.

El desarrollo de los OCs y los OBs están inseparablemente vinculados ya que ambos derivan de precursores originados en la médula ósea (los OBs de células madre mesenquimales pluripotenciales y los OCs de células hematopoyéticas del linaje monocito/macrófago) y la diferenciación osteoblástica es un prerequisite para el desarrollo de los OCs. (40)

#### Células de revestimiento:

Son células alargadas y planas con un núcleo en forma de huso, sin apenas organelas citoplasmáticas; lo que indica su escasa actividad en el metabolismo celular y la síntesis proteica (15,35,38,42). Se consideran OBs inactivos o en reposo que cubren la superficie del hueso (15,35,40). Las células de revestimiento se encuentran muy próximas y unidas entre sí y a su vez a las prolongaciones de los osteocitos, por medio de uniones adherentes (35). Estas células sirven como barrera selectiva entre el hueso y otros compartimentos. Esta barrera alrededor del hueso puede tener un papel en la homeostasis mineral con el complejo de OBs y osteocitos al regular los flujos de calcio y fosfato dentro y fuera de los fluidos óseos, así como en el control del crecimiento de los cristales óseos al mantener un microambiente adecuado (35,40). Las células que recubren el hueso son capaces de formar hueso sin reabsorción ósea previa, en respuesta a los agentes anabólicos óseos (40). Además, las células de revestimiento óseo están involucradas en la reabsorción ósea osteoclástica; digieren la membrana endóstica por proteasas neutrales y se contraen para permitir el acceso de los OCs al tejido mineralizado (15,40).

#### Osteocitos:

Los osteocitos son células de forma estrellada que constituyen el estadio final de la línea

osteoblástica tras perder gran parte de sus orgánulos siendo incapaces de renovarse (38,40,45). Poseen los mismos marcadores que los OBs, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en OBs y en células de revestimiento (38).

Son las células más abundantes del hueso (unas 10 veces más que los OBs) (38,40,46,47). Son los OBs que una vez han alcanzado el final de su actividad osteogénica y la matriz ósea se mineraliza, quedan atrapados dentro de ella en cavidades denominadas lagunas osteocitarias u osteoplastos (15,35,38,40,42,45).

De los osteoplastos se irradian un gran número de conductillos calcóforos (que están llenos de fluido óseo extracelular) en cuyo interior se alojan las prolongaciones citoplasmáticas de los osteocitos que hacen contacto por medio de nexos o uniones tipo gap con las prolongaciones de los osteocitos vecinos, así como con los OBs y las células de revestimiento óseo circundantes. (15,35,38,42,46)

En consecuencia, todas estas células forman un conjunto de células intercomunicadas, permitiendo la difusión de metabolitos y moléculas de señalización así como de nutrientes y productos de deshecho, por medio de un sistema de lagunas y conductos que forman una red funcional tridimensional, conocida como sistema canaliculolacunar, o sistema de microcirculación ósea. (15,35,38)

Durante décadas se ha pensado que los osteocitos eran un tipo celular inactivo, quiescente que ocupaba un espacio, pero cada vez conocemos más funciones esenciales en las que interviene este tipo celular.

Se piensa que los osteocitos pueden estar implicados en:

- *El control del remodelado óseo:* Los osteocitos tienen un papel importante en el mantenimiento de la matriz ósea; pueden actuar como conductores de la actividad de los OCs y los OBs, como orquestadores de la remodelación ósea. (35,46)
- *La regulación de la homeostasis mineral:* Se considera que los osteocitos pueden jugar un papel importante a través del movimiento de iones mediante su amplia red de canaliculos hacia el líquido intersticial que se encuentra en la matriz que los rodea (47). En este sentido, se considera que podrían participar en los mecanismos homeostáticos de regulación rápida de la calcemia, depositando o extrayendo

pequeñas cantidades de sales de calcio cuando la homeostasis del medio interno o el metabolismo del hueso así lo requieren (35,42). La cara lacunar de la matriz calcificada es una zona de gran densidad cálcica, se piensa que esta lámina densa está bajo el control del osteocito en procesos tales como la osteólisis osteocítica. Éste tipo de osteólisis o reabsorción ósea esta causada por los osteocitos y su actividad está coordinada por acción hormonal a través de hormonas como la paratohormona (35).

- *La detección de señales mecánicas:* Los osteocitos son células mecanosensitivas y desempeñan un papel fundamental en la respuesta adaptativa del hueso a la carga mecánica (48) detectando las variaciones mecánicas en las cargas y señalizando esa información para otras células del hueso. (38,42,49)

#### Osteoclastos:

Son células multinucleadas de gran tamaño (20-100  $\mu\text{m}$ ), ricas en mitocondrias y vacuolas (15,38,40). Los OCs se localizan en la superficie interna de los túneles de Havers del hueso cortical, en las trabéculas de diámetro superior a 200 micras y en la pared externa de los huesos, bajo el periostio (50). En ausencia de situaciones específicas, los OCs son una población escasa en el esqueleto ya que apenas comprenden el 1-2% de las células óseas (46,50). Tienen una vida media de alrededor de 6 a 10 días tras lo cual sufren apoptosis (40). Los OCs poseen una serie de características inmunohistoquímicas que facilitan su identificación, entre ellas la expresión de la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). La tinción histoquímica TRAP es una técnica histológica que permite identificar tanto in vivo como in vitro, la presencia de OCs y las áreas de reabsorción en el tejido óseo (38,50).

Su función primaria es degradar la matriz ósea (15,40), disolviendo los cristales de fosfato cálcico y digiriendo el colágeno, a través de estructuras altamente especializadas (50).

Los OCs proceden de las células madre hematopoyéticas, las cuales van a dar lugar, a través de progenitores mieloides, a los monocitos circulantes y a los macrófagos tisulares (50). El órgano diana mediante diferentes señales va a definir las características finales de estas poblaciones celulares como la de los OCs en el hueso (50). Estos precursores de OCs son atraídos desde el torrente sanguíneo a zonas de la superficie ósea destinadas a ser reabsorbidas y se fusionan unos con otros formando células multinucleadas que reabsorben la matriz calcificada (47). Los mecanismos que controlan su migración y llegada a las superficies óseas aún son muy poco conocidos (50).

Componentes principales		
Células	Osteoprogenitoras	Reservorio de células precursoras.
	Osteoblastos	Síntesis y mineralización de la matriz orgánica.
	Osteoclastos	Reabsorción mineral y no mineral.
	Osteocitos	Mantenimiento de la matriz.
	Células de revestimiento	Establecimiento de un límite o barrera en el tejido óseo.
Matriz extracelular	Orgánica (≈35%)	90% Colágeno, 10% proteínas no colágenas.
	Mineral (≈65%)	80% corresponde a cristales de hidroxiapatita; el 15% a carbonato de calcio y el 5% a otras sales minerales.

Tabla 1: Resumen de los componentes principales del tejido óseo según Gomez de Ferraris ME y Campos Muñoz A en su libro *Histología y embriología bucodental*. (35)

### 1.2.2. Formación ósea

La osificación comienza durante la vida intrauterina. En el embrión existe un precursor de esqueleto que está formado solamente por tejido cartilaginoso hialino y mesénquima embrionario que ya cuenta con una forma predeterminada a partir de las seis semanas. La iniciación de la esquelotogénesis empieza con la migración de las células mesenquimales derivadas de esos linajes embrionarios a los sitios de los futuros huesos, donde forman condensaciones de alta densidad celular que delinean la forma de los mismos. Dentro de las condensaciones, las células mesenquimales se pueden diferenciar bien en condrocitos y formar un modelo cartilaginoso de los futuros huesos (formación ósea endocondral) o diferenciarse en OBs para formar hueso directamente (formación ósea intramembranosa). (51)

#### 1.2.2.1. Osificación Intramembranosa

Esta forma de osificación es característica del crecimiento de los huesos planos y del crecimiento en espesor de los huesos largos y es por tanto la que genera los huesos de la bóveda

craneal tales como: frontales y parietales, parte del occipital y del temporal; también de parte de la clavícula, de la mandíbula y el maxilar (40,42). Éstos huesos son denominados huesos membranosos debido a que su formación tiene lugar en el interior de una placa membranosa densa de mesénquima, sirviendo este tejido conectivo como plantilla para el depósito de la matriz ósea (15).

Este proceso se caracteriza por una proliferación de las células del mesénquima en torno a una red de capilares, para gradualmente modificar su forma y comenzar a diferenciarse hacia células osteoprogenitoras y OBs. Dicha transformación se inicia en ciertos puntos del hueso llamados centros de osificación y a partir de ellos el proceso se extiende al resto del hueso. Los OBs secretan matriz no mineralizada o tejido osteoide (esta sustancia da al tejido aspecto membranoso) que progresivamente se va mineralizando. Esta mineralización es consecuencia de la liberación de una enzima llamada fosfatasa alcalina por parte de los OBs. Estos OBs, una vez rodeados por la matriz ósea, se transforman en osteocitos.

De esta manera se van formando islotes/espículas o trabéculas sueltas (rodeadas por tejido conectivo muy vascularizado) que poco a poco van creciendo y van interconectando para formar el hueso trabecular primario o esponjoso. En algunos lugares se forma el hueso compacto cuando los espacios entre la esponjosa primaria se rellenan por hueso nuevo organizado alrededor de canales de tejido conectivo vascularizado (osteonas o sistemas de Havers primarios). Este hueso es gradualmente reemplazado por osteonas o sistemas de Havers secundarios. (40)

Las porciones de cubierta conjuntiva que no sufren osificación forman el endostio y el periostio.

#### **1.2.2.2. Osificación endocondral**

Forma la mayoría de los huesos de la base del cráneo, de la columna vertebral, la pelvis y de las extremidades. Estos huesos se desarrollan sobre un modelo de cartílago hialino embrionario, denominándose huesos cartilagosos. Además es responsable de la formación y el crecimiento longitudinal de los huesos largos. (40)

Durante la osificación indirecta o endocondral, las células del cartílago (condrocitos) proliferan y depositan matriz hasta que se forma un modelo cartilaginoso del futuro hueso. Las células cartilaginosas maduran, crecen y la matriz es progresivamente calcificada. Dicha matriz

sirve como una base sólida que se cubre primero con hueso y luego es sustituido por el mismo. Los moldes de cartílago hialino están rodeados por una capa de mesénquima vascularizado y compacto que en una etapa inicial forma el pericondrio y posteriormente se convierte en periostio. (15,40)

El reemplazo del cartílago por hueso mineralizado es un proceso complejo, desencadenado por la diferenciación de condrocitos proliferantes en el centro del cartílago primario a un estado hipertrófico no proliferativo. Esto continua con la invasión de pre-osteoblastos, OCs, células endoteliales vasculares y células hematopoyéticas desde el pericondrio al cartílago hipertrófico. (51)

El cartílago hipertrófico es reabsorbido por los OCs, que disgregan la matriz calcificada (51). Los pre-osteoblastos entrantes se diferencian en OBs que se disponen siguiendo las paredes de las lagunas grandes neoformadas (cavidades formadas tras la reabsorción de la matriz del cartílago) y depositan hueso sobre las espículas cartilaginosas calcificadas restantes (51). Los núcleos de cartílago calcificado no reabsorbido forman el sustrato en el cual los OBs aposicionan hueso inmaduro para formar la esponjosa primaria (40). Las células hematopoyéticas y endoteliales establecen la médula ósea en lo que se convierte en un centro de osificación primario (51,52). El hueso trabecular reticular o inmaduro posteriormente se irá remodelando hasta formar hueso maduro, secundario o laminar.

Por su parte, a partir del centro primario de osificación en la diáfisis del hueso, la osificación endocondral progresa gradualmente hacia los extremos del modelo cartilaginoso formándose centros de osificación secundaria en uno o ambos lados del hueso en desarrollo (51). Al nacer la diáfisis del hueso suele estar completamente osificada, pero las dos epífisis siguen siendo cartilaginosas. Poco después aparecen centros de osificación en las epífisis en las cuales continúa la osificación endocondral.

Entre los centros de osificación diafisiario y epifisiario permanece cierto tiempo una lámina cartilaginosa, llamada **lámina o cartílago de crecimiento**, que tiene un papel importante en el crecimiento longitudinal del hueso (51,53). En esta zona continua la osificación endocondral (15). Cuando el hueso ha alcanzado su longitud completa, las láminas de crecimientos se adelgazan y son finalmente reemplazadas por hueso en varios momentos después de la pubertad quedando las epífisis consolidadas con las diáfisis (51).

### **1.2.3. Tipos de hueso y organización estructural**

La clasificación de los diferentes tipos de hueso se puede hacer desde diferentes puntos de vista como desde su diferente osificación como ya hemos visto, su estado de maduración, su organización estructural,....

#### **1.2.3.1. Clasificación según el proceso de formación y maduración**

Desde el punto de vista del proceso de formación y maduración, el tejido óseo se clasifica en dos tipos: hueso primario o inmaduro y hueso secundario, maduro o laminar.

La diferencia en la microarquitectura entre el hueso laminar y el hueso inmaduro es frecuentemente el resultado de diferentes ratios de coordinación y actividad secretora de las células (39). En ambos tipos hay presencia de osteocitos en sus lagunas con sus proyecciones citoplasmáticas comunicantes en los canalículos. A partir de la orientación de las fibrillas colágenas puede identificarse:

- *Hueso inmaduro o primario*: Es un material provisional menos organizado que será reabsorbido y reemplazado por hueso laminar o maduro (40). Es el resultado de un crecimiento rápido. Se podría distinguir:

- Hueso amorfo: Se forma predominantemente en embriones y niños en crecimiento, siendo reemplazado después por hueso laminar. En el adulto, el hueso amorfo reaparece cuando se precisa una formación ósea acelerada, como en el callo óseo durante la reparación de una fractura y en algunas condiciones patológicas. En el hueso amorfo, las fibras colágenas se orientan aleatoriamente, hay un número elevado de osteocitos y una elevada densidad mineral. (15)
- Hueso primario propiamente dicho: se deposita durante las fases precoces de formación ósea, así como durante la aposición ósea perióstica y endóstica. Las fibrillas colágenas transcurren paralelas a la superficie ósea pero carecen de una organización laminar. (15)

- *Hueso maduro o secundario:*

- Hueso laminar: Posee una estructura mucho más compleja. Cada lámina es de aproximadamente 3-7  $\mu\text{m}$  de grosor y contiene fibrillas colágenas paralelas; la orientación de las fibrillas cambia de una lámina a otra (15,40). Es el resultado de un crecimiento óseo lento durante el remodelado. Estas diferentes orientaciones de las sucesivas laminas le confieren gran resistencia.

### 1.2.3.2. Clasificación desde el punto de vista estructural

Desde el punto de vista estructural, el tejido óseo se organiza de dos formas: hueso trabecular o esponjoso y hueso cortical o compacto (Fig. 1).

- *Hueso esponjoso o trabecular:* Representa aproximadamente el 20% de la masa y el 67% de la superficie ósea (40). Está constituido por trabéculas o espículas óseas; en ellas, las laminillas óseas forman estructuras laminares que se disponen de manera tridimensional constituyendo una especie de red de aspecto esponjoso. Entre las espículas óseas quedan espacios amplios donde se encuentra la médula ósea, compuesta por tejido graso (médula ósea amarilla) y por células progenitoras de las células sanguíneas (médula ósea roja).

Las propiedades mecánicas del hueso esponjoso dependen del grado de porosidad y de la arquitectura de las trabéculas. Las trabéculas se orientan de forma paralela con relación a las grandes fuerzas de presión. La disposición reticular trabecular y la gran cantidad de vasos sanguíneos que acompañan a las trabéculas o espículas garantizan un aporte de nutrientes a las células de la médula ósea o hematopoyética y también sirven para transportar las células sanguíneas maduras a la circulación general.

Es un hueso menos denso, con menor contenido mineral, más elástico y con un alto recambio, en comparación con el hueso cortical, por lo que tiene una mayor función metabólica. La unidad estructural es el paquete trabecular o hemiosteona (40).

- *Hueso cortical o compacto:* Representa aproximadamente el 80% de la masa y el 33% de la superficie ósea. Es un hueso denso que rodea al trabecular y forma la capa más

externa de los huesos. Proporciona mayor resistencia mecánica y protección. En este tipo de hueso las laminillas óseas se disponen de manera circular y concéntrica alrededor de un vaso sanguíneo. En conjunto integran estructuras cilíndricas denominadas sistemas de Havers u osteonas que representan la unidad estructural principal. (40)

Una osteona típica tiene un diámetro de 200-250  $\mu\text{m}$ ; en el centro de cada osteona, el conducto de Havers está recubierto por una única capa de OBs que cubren la superficie y cada conducto aloja un capilar e inervación. Las osteonas adyacentes se encuentran interconectadas por los conductos de Volkmann, los cuales contienen vasos sanguíneos, creando de esta manera una rica red vascular a través del hueso compacto.

Las osteonas forman aproximadamente dos tercios del volumen del hueso cortical; el tercio remanente es hueso intersticial compuesto por remanentes de osteonas antiguas y láminas circunferenciales subperiósticas y subendósticas. Los sistemas laminares intersticiales (entre osteonas) tienen laminillas orientadas cada una en dirección opuesta a las adyacentes para así resistir a los diferentes tipos de fuerzas. (40)

La mayoría de los huesos contienen ambos tipos de configuración ósea, aunque en distintas proporciones y cantidades. Ambos tipos de hueso (cortical y esponjoso) difieren en el desarrollo, arquitectura, función, proximidad a la médula ósea, aporte vascular, velocidad de recambio, propiedades biomecánicas,... (40)

La morfología general del hueso, le permite tener una estructura rígida y ligera a la vez, ya que el hueso cortical facilita la rigidez mientras que las trabéculas internas minimizan el peso (36).

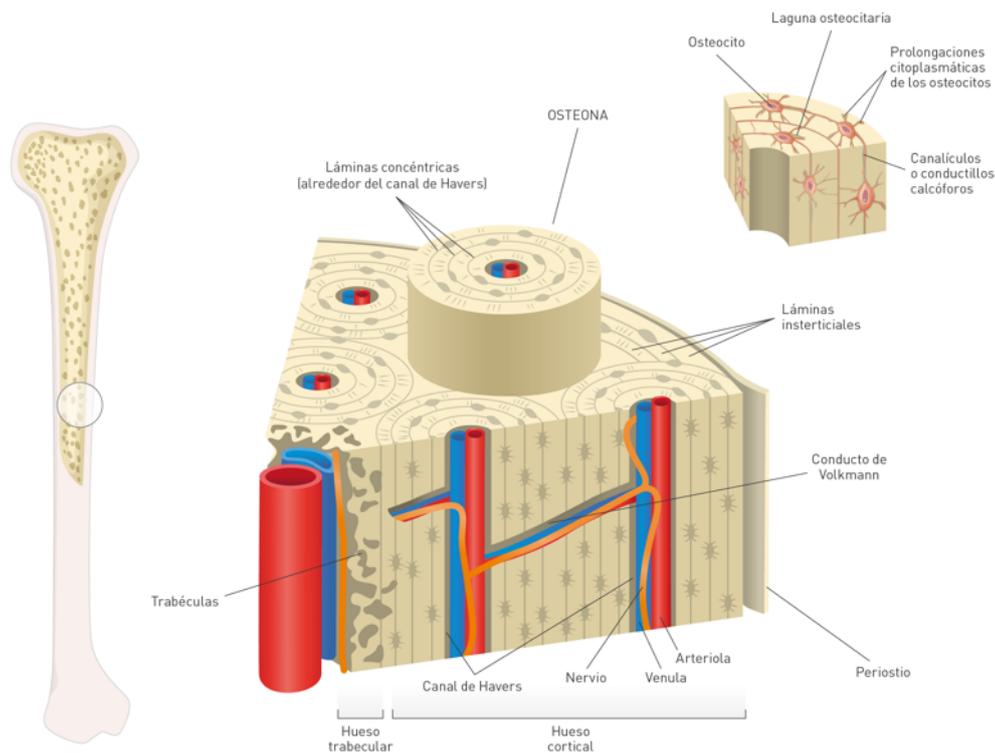


Fig. 1: Visión general de la distribución del tejido óseo. Adaptado de “Advances in Bone Tissue Engineering” (54).

#### 1.2.4. Envolturas óseas

A diferencia del cartílago, que crece tanto intersticial como aposicionalmente, el hueso únicamente crece aposicionalmente debido a su naturaleza no expandible de tejido óseo mineralizado, por ello todas las actividades óseas ocurren en las superficies óseas (40). El tejido óseo tiene dos principales superficies: endóstica y perióstica.

El periostio es una capa de tejido conectivo fibroso especializado, sumamente vascularizada e inervada, que recubre la parte externa o perióstica de los huesos, excepto en las zonas de unión a otro hueso, donde generalmente se encuentra tejido cartilaginoso articular.

Microscópicamente el periostio se compone de dos capas: una capa externa de tejido conectivo fibroso y una capa interna o “cambium” de células indiferenciadas (40). La capa externa “fibrosa” consiste en fibroblastos, colágeno y elastina junto con inervación y red microvascular (55), estos componentes proveen estabilidad mecánica al periostio (56). La capa interna es altamente celular (células mesenquimáticas progenitoras, OBS, fibroblastos) y se

adhiera fuertemente a la superficie externa de los huesos mediante haces de fibras colágenas denominadas fibras de Sharpey, que se introducen en forma perpendicular desde el periostio hacia las laminillas más externas del hueso cortical o compacto.

El periostio es más grueso en los primeros años de vida, disminuye su grosor al avanzar la edad ya que con los años disminuye el número de OBs conllevando a una atrofia y adelgazamiento del cambium (55,57).

El endostio (periostio interno) es la membrana que tapiza las paredes de la cavidad medular de las trabéculas óseas, los canales de Havers y las paredes internas de los huesos largos compactos. Es una capa celular fina (0,1-0,5  $\mu\text{m}$ ) compuesta de tejido conectivo (fibras de colágeno tipo III) y una capa de células óseas (células osteoprogenitoras, OCs, OBs y células de revestimiento óseo) (40,57).

El periostio y el endostio son esenciales para el crecimiento óseo, cicatrización de una fractura y el remodelado óseo (40,58).

### **1.2.5. Funciones del hueso**

El hueso es un órgano vivo en constante actividad. Tiene además una serie de funciones muy importantes:

1. Función locomotora: El esqueleto supone una base mecánica para el movimiento y la locomoción debido a la interacción de los huesos con los músculos y las articulaciones. La musculatura usa el tejido óseo como sitio de inserción y sostén para ejercer su acción mecánica. Los huesos actúan como palancas, donde se insertan músculos y tendones, actuando como agentes pasivos mientras que los músculos son los agentes activos, que tirarían de los huesos para moverse.
2. Función masticatoria: Base mecánica para el movimiento durante la masticación dando además soporte y sostén a los dientes.
3. Función estructural: Proporcionando el soporte interno del cuerpo y protegiendo los órganos vitales. Protege órganos y sistemas dependiendo de los segmentos corporales donde nos encontremos. Por ejemplo el cráneo protege al encéfalo. También protegen el esternón y las costillas, en este caso al corazón, los pulmones y los troncos arteriovenosos. Los huesos de la pelvis protegen al aparato reproductor, urinario y

digestivo. La columna vertebral protege la médula espinal y a los nervios raquídeos que salen de la médula.

4. Soporte de las cargas: Hay determinados huesos que soportan mucha carga como los de la columna vertebral y los de las extremidades inferiores.
5. Alojamiento de la médula ósea: fuente de células hematopoyéticas.
6. Homeostasis fosfocálcica: Intervienen en la regulación de la calcemia. Actúa de reservorio de minerales (calcio, sodio, potasio, magnesio, fósforo,...).
7. Regulación de la respuesta inmune: Osteoinmunología.

Probablemente debido a que estas funciones son de vital importancia, el hueso dispone de una capacidad excepcional de auto-cicatrización, reparación y regeneración (15,59).

En este sentido el hueso es renovado constantemente por un proceso conocido como remodelado óseo.

#### **1.2.6. Mecanismos necesarios para el adecuado funcionamiento y mantenimiento óseo**

El tejido óseo es un tejido altamente dinámico que está en continua regeneración. Su estructura y su tamaño van cambiando desde el nacimiento hasta la consolidación en la edad adulta; además el hueso tiene la capacidad de cambiar para adaptarse a las nuevas demandas funcionales que el día a día puede plantear al individuo. (59) La respuesta del hueso ante los estímulos mecánicos locales ya fue descrita por Wolff en 1892 que estableció la hipótesis de que “cada cambio de la forma y la función del hueso, o sólo de la función, conlleva cambios definitivos en la arquitectura interna y la conformación externa, siguiendo leyes matemáticas”.

El proceso de regeneración ósea persiste por tanto tras la finalización del crecimiento esquelético. El hueso inmaduro es estructuralmente inferior al hueso maduro; además la calidad del hueso adulto se deteriora con el tiempo, por lo tanto el hueso debe reemplazarse o renovarse durante toda la vida (40). El reemplazo de hueso inmaduro (primario) y de hueso viejo o dañado por la carga física diaria ocurre por reabsorción seguido de la formación de hueso lamelar nuevo en esas mismas zonas mediante un proceso llamado remodelado óseo, lo que permite seguir manteniendo intacta la estructura y funcionalidad ósea (40). El remodelado óseo produce y mantiene el hueso permitiendo que sea biomecánica y metabólicamente competente (40,42,60).

### 1.2.6.1. Mecanotransducción

Se cree que una de las funciones principales de los osteocitos es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas y transformando estos estímulos físicos en señales biológicas que modularán la actividad celular, proceso conocido como mecanotransducción (38,49,59). Serán estas señales las que dirigirán los cambios necesarios en la arquitectura ósea respondiendo al proceso de adaptación mecánica (59).

En definitiva, para provocar un cambio significativo del tejido óseo existente, en relación con la adaptación a las cargas mecánicas que el hueso sufre durante su función, los OBs y los OCs deben estar informados sobre las necesidades locales de aumento, reducción o reorientación del tejido. Esta información es transmitida por medio de los osteocitos. (45)

La consecuencia inmediata de la carga mecánica sobre el hueso, es la transferencia de tensión y esta produce deformación de la matriz calcificada. Al menos dos mecanismos de percepción de la carga mecánica (mecanorrecepción) son factibles (Fig. 2): Primero, la tensión directa sobre las células transferida a través de la matriz extracelular que está conectada con la membrana celular y el citoesqueleto, puede desencadenar una respuesta celular. Esta teoría se ha observado *in vitro*, al aplicar tensión a células óseas aisladas, lo cual genera una serie de respuestas, incluida la liberación de AMPc y prostaglandinas en el medio. En segundo lugar, las modificaciones en el flujo del fluido canalicular como resultado de la carga provocan su desplazamiento hacia zonas de menor presión, pudiendo activar a los osteocitos. (45,49)

Efectivamente, el movimiento del fluido dentro de la extensa red de canalículos que conectan los osteocitos puede verse influenciado por estímulos mecánicos del entorno y generar fuerzas, cambios en la velocidad o en la presión ejercida sobre las células óseas, lo que sería capaz de activar toda una batería de receptores de membrana, que serán los encargados de comenzar la cascada de señalización intracelular, que a su vez dirija las respuestas biológicas necesarias para responder a ese estímulo mecánico determinado. De hecho, se ha observado que el flujo de fluido canalicular fisiológico ( $0,6 \pm 0,3$  Pa a una frecuencia de 5Hz) inhibe la apoptosis de los osteocitos, mientras que el estancamiento del fluido la favorece. (59)

Para que se produzca la transducción de los estímulos mecánicos externos (fluido canalicular o deformación de la membrana celular) en señales biológicas intracelulares dentro del osteocito, se hacen indispensables diversos mecanorreceptores entre los que se encuentran

diferentes integrinas, adhesiones focales, estructuras ciliares y diferentes proteínas de membrana o receptores. (59)

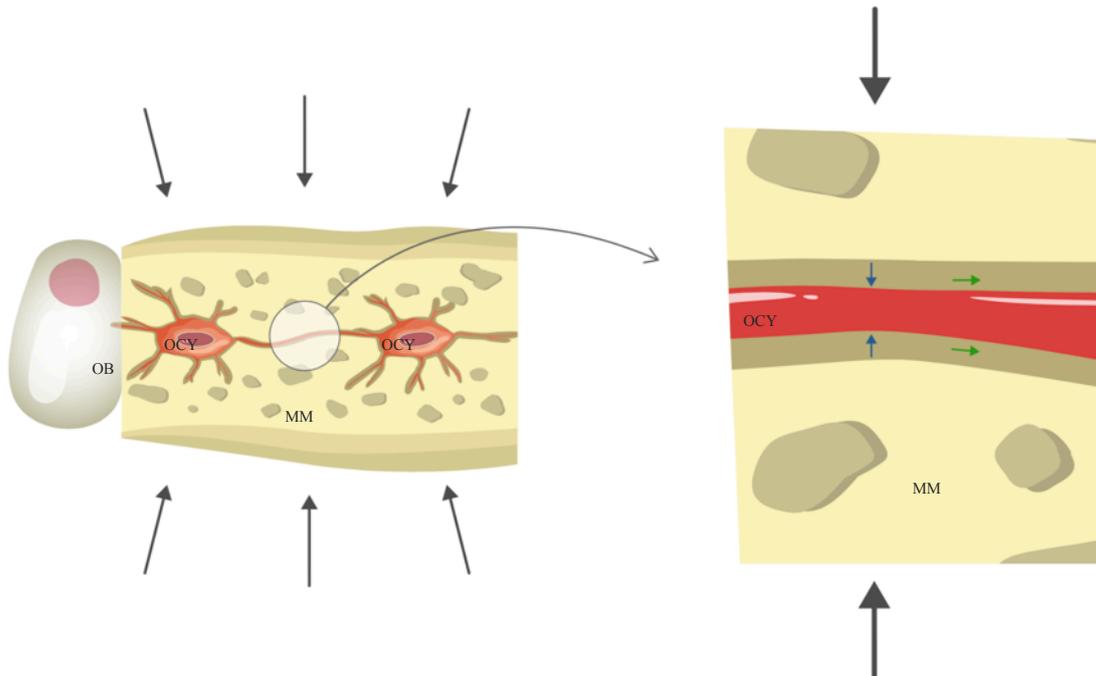


Fig. 2: Diagramas de percepción de la señal. A: se representa la red celular de osteocitos-OBs de una porción de tejido óseo bajo estrés o carga (flechas grandes). B: se muestra el recuadro ampliado de A. La carga (flechas grandes) resulta en 1) deformación del proceso celular (flechas pequeñas verticales) así como en 2) perturbación del flujo de fluido en la matriz extracelular canalicular (flechas horizontales). OCY: Osteocitos; OB: Osteoblasto; MM: Matriz mineralizada. Adaptado de “Function of Osteocytes in Bone” (49) y “Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling” (45).

Los osteocitos parece que usan entre otras, la vía Wnt/ $\beta$ -catenina para transducir las señales de carga mecánica a las células de la superficie ósea (49). Las Wnts son glicoproteínas extracelulares que actúan por diferentes vías de señalización (49). Entre las funciones de la señal Wnt está de la de controlar y promover la diferenciación osteoblástica e inhibir la apoptosis de los OBs (61).

En respuesta a la carga, se activa en los osteocitos la vía Wnt/  $\beta$ -catenina por la unión de las Wnt a el receptor “Frizzled” o a su co-receptor (LRP5 o LRP6) (49,61). Esa unión desencadena diferentes acciones en las proteínas intracelulares de esta cascada activando mediante fosforilación a la proteína Dsh (Dishevelled), lo que inhibe la quinasa GSK-3 $\beta$

(Glicogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ) que controla los niveles intracelulares de  $\beta$ -catenina, con lo que se acumula  $\beta$ -catenina en el citoplasma y pasa al núcleo (translocación) induciendo cambios en la transcripción génica como la disminución de la esclerostina y la proteína extracelular Dickkopf 1 (Dkk-1) y el aumento en la expresión de Wnt (49,61,62), promoviendo todos estos cambios la formación ósea. Dkk-1 expresada por varias células pero ampliamente expresada por los osteocitos inhibe la activación de Wnt uniéndose a LRP5/LRP6 y a la proteína transmembrana llamada Kremen (49,61,62). La esclerostina (proteína extracelular) expresada únicamente por los osteocitos, es un potente inhibidor de la formación ósea, ya que inhibe la señalización de los ligandos Wnt mediante la unión a co-receptores tipo LRP (49,59,61).

Además, tras el estímulo, el osteocito genera moléculas de señalización como prostaglandinas (PGEs) y óxido nítrico (NO); éstas moléculas de señalización son fácilmente permeables a través del fluido extracelular lacunar y canalicular a las superficies accesibles por los OBs y OCs (61,63). La prostaglandina 2 (PGE<sub>2</sub>) se puede unir a sus receptores EP2 y/o EP4 en el osteocito inhibiendo también la quinasa GSK-3 $\beta$ , lo que permite la entrada de  $\beta$ -catenina aumentando por tanto sus niveles intracelulares (49,64) donde a través de un receptor nuclear, pasa al núcleo (translocación), pudiendo existir de esta manera cierto solapamiento con la vía Wnt /  $\beta$ -catenina (52). A su vez, la PGE<sub>2</sub> puede estimular la formación de OCs a través de la producción del factor estimulador de colonias (CSF) y del ligando del receptor activador nuclear kappa-B (RANKL); también se ha relacionado con la inducción de osteopontina dentro de los OCs (63).

Cuando el tejido óseo está pobremente cargado (recibe baja o nula estimulación mecánica), se disminuye la producción de factores anabólicos y se estimula la producción de esclerostina y Dkk-1 por los osteocitos que son como ya hemos comentado, inhibidores de la actividad osteoblástica (65).

Por tanto, parece que puede haber implicadas en la adaptación mecánica varias moléculas y vías de señalización aunque no se conocen completamente. Es necesario, por consiguiente, comprender de una forma más integral cómo los osteocitos perciben la carga mecánica y la transducen en señales bioquímicas que finalmente alteran el comportamiento de varias células óseas para producir su respuesta. (52)

### 1.2.6.2. Osteoclastogénesis y reabsorción ósea osteoclástica

En el proceso de inducción y maduración de los OCs desempeñan un papel importante (38,66):

- M-CSF: el factor estimulante de colonias de macrófagos.
- RANK: receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B, situado en la membrana de OCs y pre-osteoclastos.
- RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B situado en la superficie de OBs y pre-osteoblastos, es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral.
- OPG: la osteoprotegerina, proteína circulante sintetizada por OBs y pre-osteoblastos.

La formación de los OCs desde los precursores está predominantemente regulada por las células osteoblásticas (38,47). Las células osteoblásticas en la matriz ósea expresan dos citoquinas (M-CSF y RANKL) necesarias para la diferenciación de los pre-osteoclastos en OCs (47).

El M-CSF se une a su receptor en los pre-osteoclastos (C-FMS), requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas (38,47). Por otro lado, RANKL ubicado en la superficie de los OBs y liberado por proteólisis para convertirse en un ligando soluble se une a su receptor (RANK) que se localiza en la superficie de los pre-osteoclastos activando la señalización para inducir el reclutamiento, la diferenciación y la activación (38,47). Al activarse RANK, la proteína adaptadora citoplasmática (TRAF-6) adapta la señal y activa factores citoplasmáticos que llevan la información hacia el núcleo (66).

Estas células, tras la interacción entre RANKL y su receptor RANK se transformarán en OCs maduros, polarizados y con el citoesqueleto característico de los OCs activos, responsables de la reabsorción ósea (38,50). La expresión de RANKL por los OBs coordina por tanto el remodelado óseo estimulando la reabsorción ósea por los OCs cercanos, quienes a su vez, en un proceso denominado “coupling o acoplamiento”, estimulan la síntesis ósea por parte de los OBs adyacentes (66,67).

La formación y actividad de los OCs está limitada por una variedad de citoquinas y en particular por la osteoprotegerina (OPG), proteína soluble relacionada con la familia del receptor para el factor de necrosis tumoral (TNFR), que inhibe los efectos de RANKL al unirse a él

previniendo la unión de éste a RANK (38,47,66,67). Debido a la capacidad que tiene OPG de unirse al RANKL evita que se produzca una sobre estimulación de los OCs e inhibe la reabsorción ósea. RANKL por tanto, se puede unir indistintamente con OPG o con RANK, debido a su similitud en los sitios de unión, lo que tiene como consecuencia que la actividad biológica de RANKL (inducción y proliferación osteoclástica) se disminuye por efecto de su unión con el competidor o receptor señuelo OPG (66).

Varias hormonas, citoquinas y factores humorales producidos en distintos órganos pueden influir también en la expresión de receptores de superficie de los OCs y en la expresión de RANKL y/o OPG entre otros. Entre los factores catabólicos o pro-reabsortivos que estimulan la osteoclastogénesis por diferentes vías podemos destacar: la paratohormona, la vitamina D, la PGE<sub>2</sub>, la interleuquina 1 (IL-1), corticosteroides,... y entre los factores anabólicos o antireabsortivos podemos destacar: estrógenos, calcitonina, TGF- $\beta$ , BMPs,... (66,67)

#### Reabsorción ósea por parte de los OCs

Los OCs que están reabsorbiendo hueso activamente se encuentran en unas cavidades de la superficie ósea llamadas cavidades de reabsorción o lagunas de Howship (15,40). Se desplazan, mediante podosomas, sobre las superficies calcificadas, donde una sola célula puede labrar, de forma consecutiva, varias lagunas de Howship (50). Los OCs al activarse inducen la expresión de genes que codifican entre otros la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), la catepsina K (CATK), el receptor de calcitonina e integrinas específicas siendo todos ellos característicos de los OCs maduros (66,67).

Cuando los OCs están activos están polarizados, el citoesqueleto de actina se reorganiza y los OCs muestran dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo o borde rugoso con numerosos pliegues citoplasmáticos que forman abundantes microvellosidades, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara rica en microfilamentos, con integrinas a través de las cuales los OCs se unen a la superficie a reabsorber generando un compartimento sellado al interactuar las integrinas con proteínas de la matriz extracelular (38,40,50,66,67). Ese compartimento sellado (laguna de Howship) permite crear un microambiente en donde se producen los fenómenos de reabsorción (Fig. 3) (35,38,40,50). Esta unión se produce por la acción de diversas integrinas del osteoclasto, particularmente  $\alpha\beta 3$ , que reconocen la secuencia Arg- Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y en otras proteínas de la matriz osteoide (38).

Los OCs solubilizan tanto el componente mineral como el orgánico de la matriz (40). Para la disolución de la HA se requiere de un medio acidificado, esto se produce porque los OCs poseen en el citoplasma anhidrasa carbónica que genera ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) a partir de dióxido de carbono y agua. Posteriormente el ácido carbónico se disocia en protones ( $\text{H}^+$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), siendo este último intercambiado por cloro ( $\text{Cl}^-$ ) mediante un canal específico, lo que permite la conservación del estado isoeléctrico intracelular (40,50). El protón se dirige al ribete en cepillo, donde una bomba de protones dependiente de una ATPasa específica ( $\text{H}^+$ -ATPasa) lo transporta a través de las microvellosidades a la laguna (40,50,66,67). En la vecindad de esta bomba se sitúa un canal iónico (canal de cloro 7,  $\text{ClC7}$ ), que aprovecha el gradiente de voltaje para transportar cloro a través de la membrana a la laguna, y su función es muy relevante en los procesos de acidificación lisosómica en general y en la reabsorción ósea en particular (50).

En la laguna, mediante la unión de estos 2 iones, se forma ácido clorhídrico, que acidifica el medio y provoca la disolución de la HA y la liberación de calcio y fosfato, manteniendo a la vez la carga iónica citoplasmática en equilibrio (50).

Por último, a través de las microvellosidades, se segregan enzimas líticas como colagenasas, fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), una cisteín-proteasa como la catepsina K (CATK) y una serie de metaloproteinasas que, finalmente, van a provocar la disolución de la matriz orgánica (40,50,66,67).

A través de este proceso, el osteoclasto erosiona el hueso subyacente. Los productos de degradación (fragmentos de colágeno, calcio y fosfato solubilizados) se transfieren dentro del osteoclasto por endocitosis a través de las microvellosidades, son transportados a la región basolateral en vesículas y se liberan al exterior por exocitosis, primero al tejido conjuntivo circundante y luego se transfieren a la luz de los capilares sanguíneos (50,66,67).

Los OCs, no sólo reabsorben el hueso, sino que también regulan la acción de otras células mediante la secreción de citocinas: influyendo en la regulación de la salida de células hematopoyéticas desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo, en la regulación de la diferenciación de precursores de OBs y actuando como células inmunes en enfermedades inflamatorias óseas. (47)

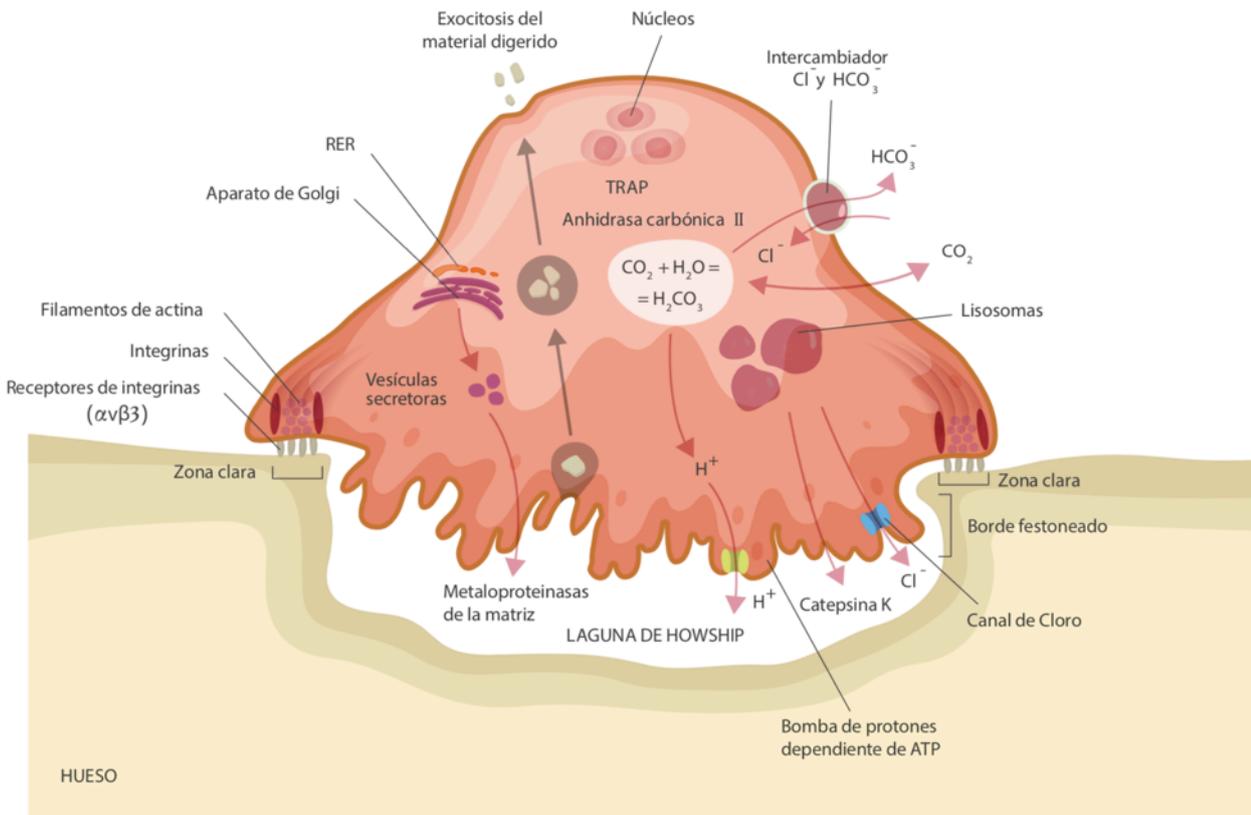


Fig. 3: Modelo de reabsorción ósea mediada por OCs. Se induce la secreción de protones y enzimas líticas en una vacuola de reabsorción sellada formada entre la superficie basal del osteoclasto y la superficie del hueso (Laguna de Howship). La acidificación de este compartimento mediante la secreción de protones conduce a la activación de la enzima fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) y la catepsina K (CATK), que son las dos enzimas principales responsables de la degradación de las matrices de minerales y el colágeno óseos. RER: Reticulo endoplasmático rugoso. Adaptado de “Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology” (40).

### 1.2.6.3. Remodelado óseo

El remodelado óseo es un proceso altamente coordinado que consiste en la reabsorción de una cantidad determinada de hueso llevada a cabo por los OCs, así como la formación de la matriz osteoide por los OBs y su posterior mineralización para rellenar la cavidad previamente creada.

Este proceso permite que anualmente se renueve un 5-10% del hueso total (15,42). El tejido óseo con mayor actividad de remodelación es el hueso trabecular. A nivel microscópico el remodelado se produce en las unidades básicas de remodelado óseo o unidades básicas multicelulares (BMU – Bone Multicellular Units) (44,68). En estas unidades hay OCs,

macrófagos, pre-osteoblastos y OBs y están regidos por una serie de factores, tanto sistémicos como locales, permitiendo el normal funcionamiento del hueso y el mantenimiento de la masa ósea (37,68).

El reemplazo periódico del hueso es imprescindible para mantener las funciones normales del esqueleto, pues hace posible reparar microlesiones de fatiga (microfracturas), cuya acumulación comprometería la resistencia del hueso. Por otro lado, permite una cierta adaptación de la estructura ósea a los requerimientos físicos predominantes. Finalmente, permite regular la homeostasis del calcio. (60,68)

En el hueso sano normal de un adulto, ambas actividades (reabsorción-formación) están acopladas, tanto en el espacio como en el tiempo y bien controladas, por lo que la masa total de hueso se mantiene constante (40,44). El acoplamiento apropiado de formación y reabsorción ósea requiere de una comunicación directa entre las diferentes células óseas (44,60,68). Cuando este proceso se desequilibra aparece la patología ósea, bien por exceso (osteopetrosis) o por defecto (osteoporosis) (60).

#### Fases del remodelado:

En la Figura 4 se representan las distintas fases del remodelado óseo que expresaremos de manera más detallada a continuación:

- *Fase quiescente o de reposo:* En cualquier momento dado, alrededor del 80% de las superficies óseas están inactivas con respecto al remodelado óseo. Estas superficies inactivas están en reposo, cubiertas de células de revestimiento y membrana endóstica (40).
  
- *Fase de activación:* La conversión de las superficies óseas quiescentes en superficies de reabsorción activas se conoce como activación (40). El factor activador de este proceso no es suficientemente conocido, pero se cree que ocurre en parte en respuesta a los requerimientos biomecánicos y estructurales locales (40). El ciclo del remodelado requiere del reclutamiento de los OCs y los medios para que ellos accedan a la superficie ósea (40). Bajo la acción de los factores osteoclastogénicos incluyendo RANKL y M-CSF, las células madre hematopoyéticas son reclutadas a zonas específicas de la

superficie ósea y se diferencian en OCs maduros (40,68). Se cree que las células de revestimiento digieren la membrana endóstica y se retraen, exponiendo así la superficie ósea mineralizada, que es quimiotáctica para los pre-osteoclastos (40). Los OCs se unen a la matriz a través de moléculas de adhesión celular (integrinas  $\alpha\beta3$ ) que reconocen secuencias específicas de aminoácidos (RGD). Se han sugerido dos señales como las principalmente responsables de la activación del proceso de remodelado: las microfracturas, que conllevan la apoptosis de los osteocitos marcando el lugar donde debe producirse la activación de los precursores osteoclásticos y la consiguiente activación de la osteoclastogénesis (65) y la señalización hormonal implicada en el metabolismo fosfocálcico (vitamina D, paratohormona,...). Los osteocitos no tienen conexiones físicas con las células de la médula; por tanto, sí actúan sobre los precursores osteoclásticos debe de ser a través de mecanismos humorales (65). De hecho, se ha demostrado que estas células producen diversos mediadores que podrían influir en la osteoclastogénesis, como óxido nítrico (NO), TGF- $\beta$ , PGEs.,... (44). Otra posibilidad es que la activación de la osteoclastogénesis sea a través de las células de revestimiento ya que los osteocitos emiten prolongaciones citoplasmáticas que constituyen una espesa red que comunica cada osteocito con otros osteocitos vecinos, así como con las células de revestimiento (44). Cabe especular que las señales enviadas por los osteocitos sean las responsables de los cambios que se producen en las células de revestimiento cuando se inicia el remodelado (44).

- *Fase de reabsorción:* Seguidamente, los OCs comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide (40,44). Este proceso permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- $\beta$ , BMPs, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor análogo a la insulina I y II (IGF-I y IGF-II) (68). Esta fase lleva de 1 a 3 semanas (68). Histológicamente se forman cavidades denominadas lagunas de Howship en el hueso esponjoso o conos de corte o cavidades de reabsorción en el hueso cortical (40).
  
- *Fase de reversión o inversión (acoplamiento):* este término se refiere al intervalo de 1 a 2 semanas entre el final de la reabsorción y el comienzo de la formación ósea. Es el momento donde las lagunas de Howship y los conos de corte están sin OCs que han muerto por apoptosis (44), pero contienen células mononucleares (40). Las lagunas de

Howship quedan cubiertas de matriz de colágeno desmineralizada sin digerir, se cree que éstas células mononucleares podrían encargarse de limpiar los restos de la reabsorción, emitir señales de activación osteoblástica y preparar la superficie ósea para el anclaje de los OBs. En circunstancias fisiológicas ocurre acoplamiento entre formación y reabsorción ósea (40), para ello es importante la comunicación entre las células que en parte se debe a factores solubles almacenados en la matriz ósea que se liberan tras la reabsorción por los OCs [IGF-I, IGF-II, TGF- $\beta$ , factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), etc.] (40). Recientemente se han sugerido otras moléculas involucradas en la comunicación celular (semaforinas que pueden inhibir la formación ósea durante la reabsorción o inhibir la reabsorción ósea durante la formación) (65).

- *Fase de formación y mineralización ósea:* En las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de pre-osteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación (3). A los pocos días, los OBs ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas y posteriormente se mineralizará (65). Tras 5-10 días se logra aproximadamente un 70% de la mineralización del osteoide neoformado, aunque la mineralización completa se logrará a los 3-6 meses desde su formación tanto en el hueso trabecular como cortical (68).

Y de nuevo empieza *fase quiescente o de descanso*. Cuando una cantidad igual de hueso reabsorbido ha sido reemplazado por nuevo tejido, el ciclo de remodelación concluye.

Cuando la formación del hueso es completa, la secreción de esclerostina (inhibidor de la formación ósea) 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 remodelado, entrando el tejido neoformado 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 ha restablecido y se mantiene hasta que el próximo ciclo de remodelado sea activado. Una vez mineralizada la matriz ósea sintetizada, los OBs pueden sufrir apoptosis, transformarse en células de revestimiento o pueden quedar atrapados en la matriz mineralizada, diferenciándose a osteocitos (44).

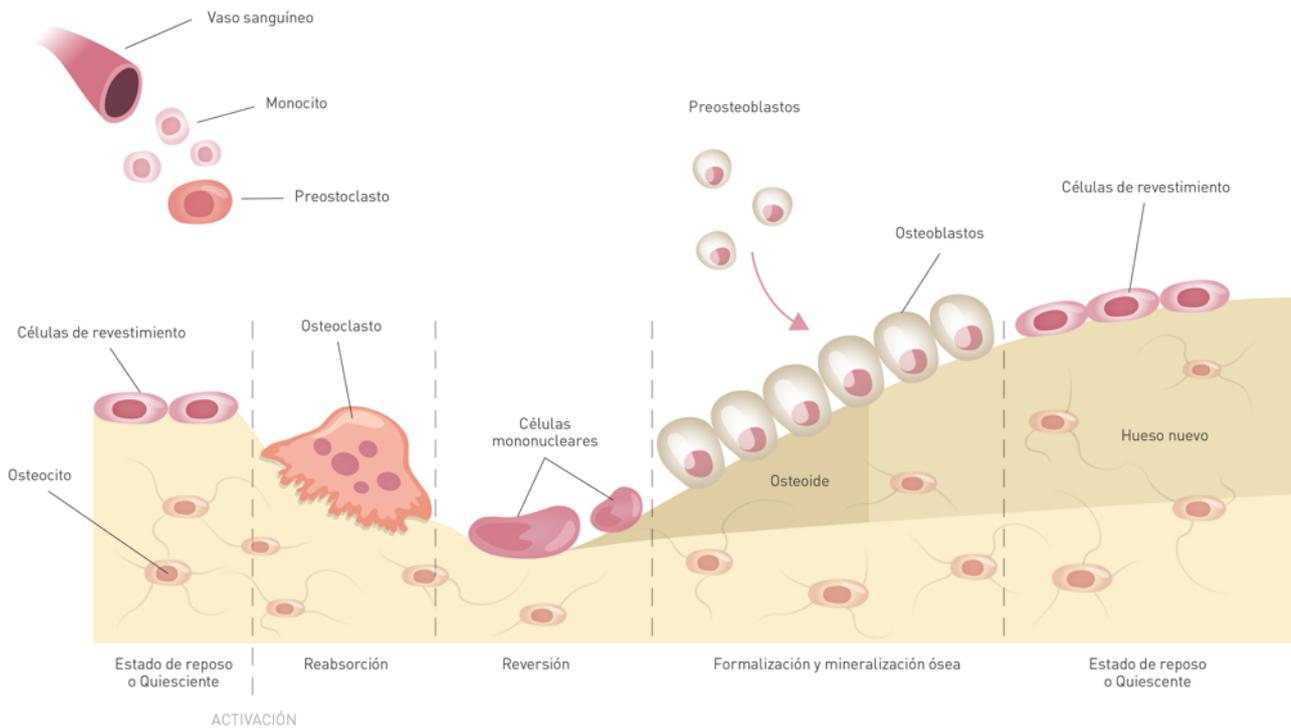


Fig. 4: Imagen de las secuencias de la remodelación ósea fisiológica. Adaptado de “Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement” (60).

#### Factores Reguladores del remodelado óseo:

El remodelado óseo normal depende del delicado equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea (15). Este equilibrio está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales (68).

La reabsorción ósea se regula a través de un sistema consistente en OPG, RANK y RANKL; cualquier interferencia en este sistema puede desviar el equilibrio entre la aposición y reabsorción ósea. La expresión del factor estimulador de las colonias de macrófagos (M-CSF) desempeña un papel esencial en este sistema regulador, además existe una serie de citoquinas y factores de crecimiento que regulan la expresión de RANKL y OPG. (15)

El proceso de recambio está influenciado por tanto, por factores generales como la paratohormona, la calcitonina, metabolitos de la vitamina D3 o estrógenos y por factores locales,

como las BMPs, los factores de crecimiento derivados de insulina (IGFs), el TGF- $\beta$ , la IL-1, la interleuquina-6 (IL-6), la interleuquina-11 (IL-11), el interferón-gamma (INF- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), la PGE<sub>2</sub>, los FGFs y el PDGF entre otros (35,60,68).

Los marcadores bioquímicos del metabolismo óseo son interesantes desde un punto de vista clínico para evaluar el proceso de remodelado. Así, hay marcadores de formación ósea, como la fosfatasa alcalina, osteocalcina y propéptidos del colágeno tipo I y marcadores de reabsorción, tales como la hidroxiprolina C, piridolina, desoxipiridolina, la fosfatasa ácida resistente al tartrato y telopéptidos del colágeno tipo I (68).

### 1.3. CICATRIZACIÓN ÓSEA.

La cicatrización es un proceso complejo que involucra una multitud de eventos intracelulares y extracelulares. La cicatrización de un tejido dañado puede conducir a la formación de un tejido que difiere en morfología o función del tejido original, este tipo de curación se llama *reparación*. La *regeneración* tisular, por otro lado, es un término usado para describir la cicatrización que conlleva una restauración completa del tejido original tanto en su morfología como en su función (37,42). La cicatrización del tejido óseo incluye tanto fenómenos de regeneración como de reparación, dependiendo de las características de la herida (37,42). El tejido óseo, a diferencia de otros tejidos (excepto el tejido embrionario) puede producir un “*restitutio ad integrum*” siempre que haya estabilidad mecánica y un adecuado suministro sanguíneo (15).

El mecanismo de formación ósea es común entre la cicatrización ósea y el remodelado, sin embargo hay una diferencia obvia entre ambos procesos: la presencia de sangre extravasada. En el remodelado, la población de células osteogénicas deriva de las células perivasculares, y estas células alcanzan la superficie ósea a remodelar por migración a través del tejido conectivo perivascular primitivo. Sin embargo, en la cicatrización de fracturas o en la cicatrización alrededor de un implante dental, la población de células osteogénicas deriva de la médula ósea (incluyendo pericitos vasculares, células estromales, células madre mesenquimáticas y, en menor extensión, osteocitos y OBs que pueden migrar desde las nuevas superficies óseas creadas) y migra a través del andamiaje temporal proporcionado por la sangre extravasada y coagulada. La estructura del hueso formado durante la cicatrización de una fractura ósea o alrededor de un implante difiere de la formada durante el remodelado, ya que durante la cicatrización ósea se forma hueso inmaduro o “*woven bone*” comparado con el hueso maduro o “*lamellar bone*” formado durante el remodelado. (39)

Con una fractura ósea ó al perforar el lecho de un implante se crea una solución de continuidad donde, además de desencadenarse una respuesta inflamatoria, hay un daño en los vasos sanguíneos y esto provoca una hemorragia. La hemorragia producida resulta en la formación de un coágulo sanguíneo o un hematoma. Además de la formación del coágulo, otros dos mecanismos contribuyen a la hemostasis. Primero, la vasoconstricción transitoria en los extremos de los vasos sanguíneos locales rotos limita la cantidad de sangre que entra en el tejido dañado. Segundo, la retracción del coágulo condensa el tapón hemostático y reduce el tamaño de la herida. Las fuerzas de retracción están causadas por la migración celular (células osteogénicas

y sobre todo plaquetas activadas) que generan fuerzas de tracción (por contactos adhesivos) sobre la matriz extracelular, resultando en la condensación de los filamentos de fibrina del coágulo. Estas fuerzas contráctiles idealmente no deberían exceder la capacidad de retención del coágulo (fuerzas adhesivas) de las superficies. (39)

La degranulación de las plaquetas en el coágulo sanguíneo conlleva la liberación de diferentes citoquinas y factores de crecimiento (PDGF, IGF-I, IGF-II, VEGF, TGF- $\beta$ ,...) que tienen un efecto estimulante en la regeneración de la fractura. Por tanto, las plaquetas tienen una doble función: la hemostasia y la liberación de factores para la cicatrización. (39,69)

Como consecuencia de la hemostasis, la circulación sanguínea revierte a las ramas no dañadas más cercanas de los vasos que se anastomosan con partes intactas de otros vasos (39). El cese de circulación en las terminaciones rotas de los fragmentos causa isquemia local y necrosis. La necrosis causada por la ausencia de aporte de oxígeno es un mecanismo complejo que involucra mecanismos feedback entre multitud de factores de señalización, mitógenos y quimioatrayentes y es el preludeo a la degradación del coágulo por los leucocitos (39). La diapédesis de los leucocitos en el coágulo desde las vénulas postcapilares está causada por factores que aumentan la adhesión de células inflamatorias a células endoteliales (leucotrienos) y quimioatrayentes como PDGF y TGF- $\beta$  (39). La mayoría de estos factores se liberan por las plaquetas activadas y las células endoteliales, así como por los propios leucocitos. Los productos de la degradación tisular también sirven como quimioatrayentes para los leucocitos. Inicialmente los neutrófilos son los más numerosos, pero los macrófagos rápidamente se convierten en predominantes. Ambos tipos celulares están involucrados en la degradación del coágulo y del tejido necrótico a través de mecanismos intracelulares y extracelulares (39). Los macrófagos también promueven la respuesta angiogénica e inician la cascada de la reparación (70).

Una vez que comienzan a disminuir los signos de inflamación empiezan a formarse abundantes capilares y a aumentar la actividad fibroblástica. En las fracturas, el tejido de granulación actúa como una matriz para poner en contacto los dos bordes de la fractura, debajo del periostio, que ha proliferado intensamente (callo de fractura o callo óseo).

La propagación sin perturbaciones de la formación de tejido de granulación (el 60% de la masa del tejido son vasos) depende de un anclaje o adhesión suficiente del coágulo de fibrina. (39)

La angiogénesis se inicia predominantemente desde vénulas postcapilares, donde las

células endoteliales degradan la membrana basal subendotelial y migran y proliferan hasta formar yemas o brotes capilares huecos. Aunque las puntas de estos capilares neoformados migran a lo largo del gradiente quimiotáctico hacia el centro de la herida, hay también varios contactos punta-punta o punta-vaso sanguíneo que llevan al desarrollo de bucles capilares anastomosados. Finalmente, las poblaciones de células fibroblásticas secretan matriz reticular para proporcionar soporte mecánico para el sistema vascular emergente. (39)

El crecimiento óseo invasivo en la zona de cicatrización endo-ósea, o durante el remodelado, es el resultado de la migración y reclutamiento de células osteogénicas y precede la formación ósea. Esta migración y reclutamiento se denomina osteoconducción. (39)

En la cicatrización de fracturas o alrededor de un implante, la población potencialmente osteogénica migrará a través del coágulo sanguíneo en resolución hacia la superficie de los fragmentos óseos o hacia la superficie del implante, dentro del sitio de la herida. En cada uno de estos casos, las células que avanzan hacia la superficie sólida del hueso dañado o del implante, iniciarán la síntesis de la matriz. Esas células que se diferencian justo antes de llegar a la superficie objetivo, secretarán matriz, como resultado, pararán de migrar y no llegarán a la superficie objetivo, por eso la osteoconducción resultará en espículas de hueso que avanzan hacia la superficie objetivo. Por supuesto, el osteoblasto secretor activo diferenciado se translocará o retrocederá como resultado de la secreción de la matriz, o se enterrará como osteocito en la matriz que producen. La translocación de OBs activos secretores polarizados con producción concomitante de matriz se denomina acreción o crecimiento óseo aposicional y, por lo tanto, la formación ósea durante la curación o durante la fase anabólica de remodelación comprende 2 fenómenos distintos: la formación ósea de novo y la formación ósea aposicional. (39)

La formación ósea de novo describe la cascada biológica de eventos que ocurren durante el inicio de la formación ósea por poblaciones de células osteogénicas nuevamente diferenciadas. El crecimiento óseo aposicional está gobernado por la secreción de matriz ósea colágena por los OBs polarizados. Como resultado de la acumulación de la matriz en su zona basal las células retroceden pasivamente en dirección apical. La secreción de la matriz ósea está restringida a la capa de células secretoras que recubren el hueso ya existente, el agotamiento de la población de células secretoras se produce como resultado del atrapamiento de las células en la matriz como osteocitos. (39)

En resumen, la cicatrización de la herida endo-ósea puede subdividirse en etapas de

hematoma, resolución del coágulo, reemplazo por tejido de granulación y migración de células osteogénicas que llevan a la formación del nuevo hueso en la herida. Tanto el proceso de curación ósea peri-implante como alrededor de un injerto óseo siguen una secuencia similar. (39)

Aunque el tejido óseo exhibe un amplio potencial de regeneración y puede restaurar su estructura y función original completamente, los defectos óseos pueden a veces fallar en la cicatrización con tejido óseo. 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 repararse. El tamaño crítico del defecto, por encima del cual no funciona el mecanismo de reparación natural va a depender de la edad del sujeto, el sexo y el metabolismo del mismo. Para facilitar o promover la cicatrización, se pueden aplicar técnicas quirúrgicas y/o se pueden colocar materiales de injerto en los defectos óseos. Es importante, entre otros factores, que haya un adecuado aporte sanguíneo, estabilidad en la herida, un adecuado aislamiento para evitar el crecimiento de otros tejidos diferentes a hueso en la herida endo-ósea y ausencia de infección.

### **1.3.1. La cicatrización alveolar tras la extracción dental**

Los alveolos o apófisis alveolares corresponden a las porciones de los huesos maxilares que alojan la o las raíces de los dientes. Son estructuras al servicio del diente ya que se forman con el desarrollo y la erupción de los dientes, los sostiene mientras trabajan, y desaparecen con ellos, ya que se atrofian cuando el diente es extraído. (35,71)

Se pueden describir en el alveolo una serie de elementos óseos estructurales (35,71):

- una vertiente perióstica (paredes externas; vestibular o palatina/lingual) constituida por tejido óseo compacto y revestida por periostio.
- una vertiente periodóntica también formada por tejido óseo compacto directamente relacionada con el ligamento periodontal (denominada anatómicamente lámina cribosa, radiológicamente lámina dura o histológicamente hueso fasciculado o “bundle bone”).
- entre ambas suele haber tejido óseo trabecular o esponjoso; excepto a nivel de las crestas alveolares, donde ambas vertientes compactas entran en contacto.

No existe un límite definido entre la apófisis alveolar y el hueso basal de los maxilares. Los tabiques interdentarios o interradiculares siempre presentan una abundante cantidad de tejido óseo esponjoso, revestido por dos corticales compactas, ambas periodónticas, que se unen en la cresta del tabique (Fig. 5 y 6) (35).

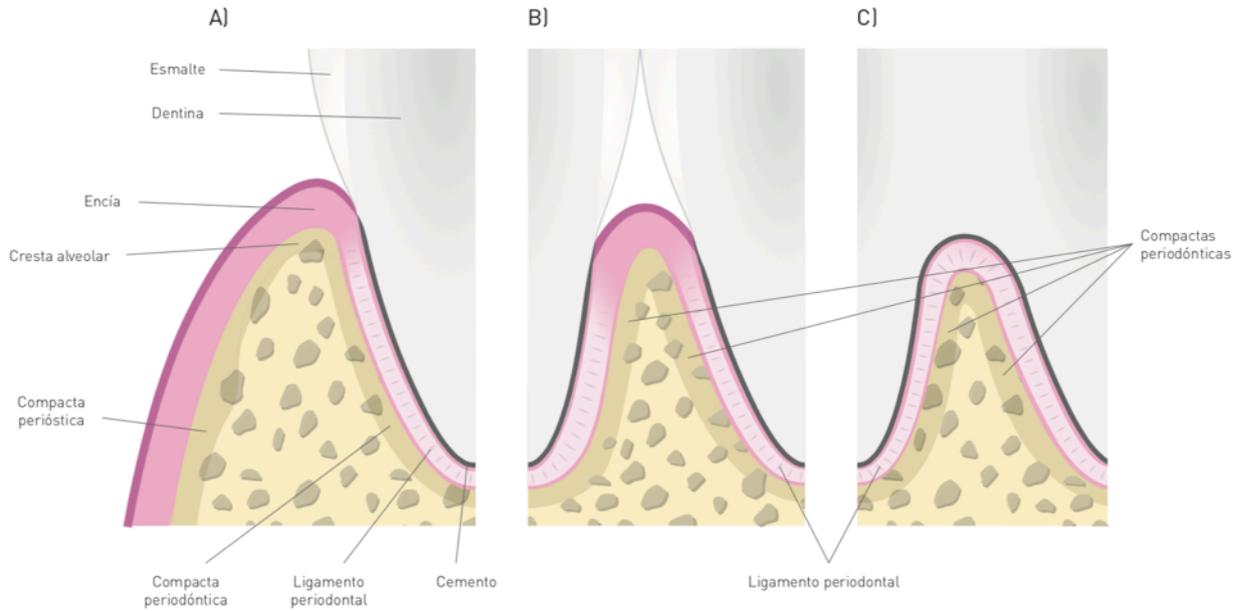


Fig. 5.: Estructura anatómica de los procesos alveolares. A: Tabla vestibular o lingual. B: Tabique interdentario. C: Tabique interradicular. Adaptado de Gomez de Ferraris ME y Campos Muñoz A en su libro *Histología y embriología bucodental* (35).



Fig. 6: En este preparado de cráneo se ven dos alveolos vacíos. Se observa perfectamente la anatomía de los alveolos, las paredes externa e interna (lámina cribosa) de los mismos. En el alveolo de la derecha se observa el tejido óseo del tabique interradicular.

La tabla cortical esta formada por hueso laminar que contiene laminillas concéntricas e intersticiales. El hueso esponjoso contiene trabéculas de hueso laminar orientadas en direcciones que les permiten captar y distribuir el estrés que se genera durante la función (masticación) y la parafunción y que en el adulto están rodeadas por una médula ósea rica en adipocitos y células mesenquimáticas pluripotenciales del estroma (35,71).

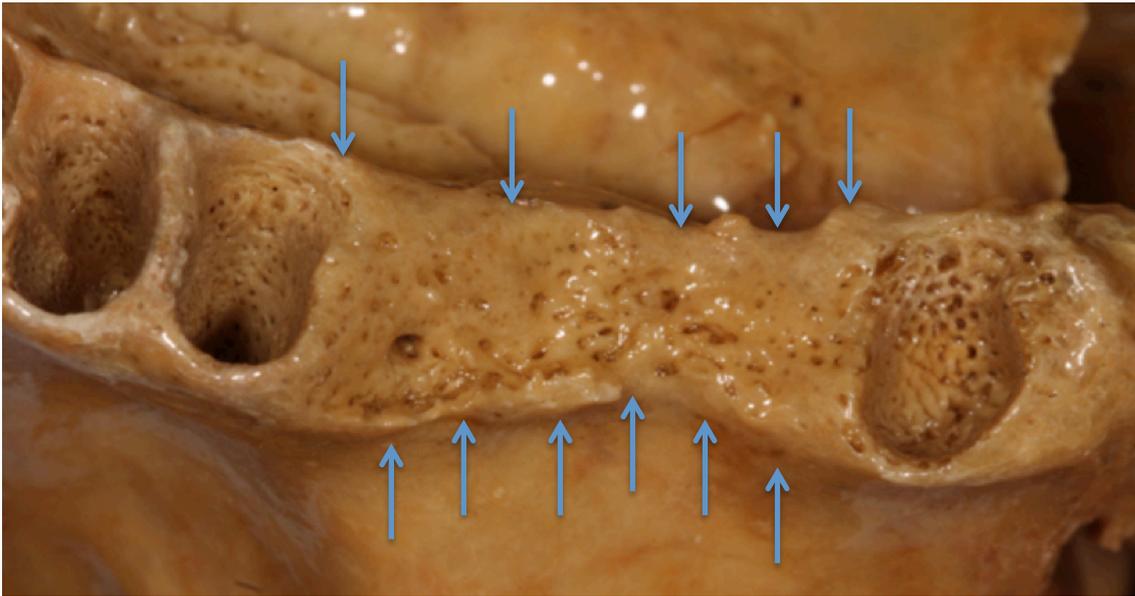
La remodelación continua del tejido óseo alveolar es consecuencia de su gran actividad metabólica. Se trata de un tejido óseo muy sensible a las fuerzas que generan presión, las cuales provocan reabsorción de la matriz y a las fuerzas que generan tensión las cuales estimulan la producción de nuevo tejido óseo (35).

Las características morfológicas de las apófisis alveolares están relacionadas con el tamaño y la forma de los dientes y dependerán de la presencia y el mantenimiento de un diente sano. La arquitectura del hueso alveolar contribuye a la conformación y preservación de los rasgos estéticos. (71,72)

La cicatrización alveolar postextracción conlleva una reabsorción fisiológica que conduce a una alteración en la morfología y una reducción del volumen final del proceso alveolar (Fig. 7). Los cambios volumétricos que acontecen en la cresta alveolar tras una extracción dental han sido ampliamente investigados ya que en ocasiones la baja disponibilidad ósea resultante, puede suponer una limitación para una posible rehabilitación mediante implantes dentales, no sólo por no contar con un soporte adecuado, sino también por relacionarse con otras complicaciones, tales como alteraciones de los perfiles de emergencia, aumento del espacio protésico, aparición de triángulos negros interdentes, etc... La mayoría de ellos, además, se relacionan con una inadecuada estética de las rehabilitaciones implanto-soportadas, lo cual es más crítico en zonas anteriores de la dentición. Esto lleva a usar prótesis dentales con formas de dientes frecuentemente más largos que los dientes contralaterales o de dientes de longitud correcta pero a los que se les añade encía rosa. Este tipo de prótesis pueden ser aceptables desde un punto de vista funcional, pero no desde un punto de vista estético. La demanda estética en Odontología ha aumentado de manera drástica en los últimos años, haciendo cada vez más necesario el mantenimiento de un volumen óseo que pueda garantizar una rehabilitación oral satisfactoria mediante unas prótesis dentales funcionales y estéticas. Hay que tener en cuenta que después de extracciones múltiples y posterior uso de prótesis removibles, el tamaño de la apófisis alveolar sufre una reabsorción extensa (74), lo cual provoca cambios en la fisonomía por disminución de la dimensión vertical, que muchas veces se traduce en alteraciones estéticas caracterizadas por

mejillas hundidas, acentuación del surco nasogeniano, aumento del ángulo goniaco, atrofia labial, etc. (35).

Las apófisis alveolares también pueden sufrir modificaciones como resultado de procesos patológicos relacionados con el diente, como por ejemplo las formas agresiva, crónica y necrosante de la periodontitis o las lesiones de origen traumático (74).



*Fig. 7: En este preparado de cráneo se ve la pérdida en anchura y se puede apreciar la pérdida en altura de la zona donde habían sido extraídos los dientes. Se observa también la anatomía de los alveolos, las paredes externa e interna (lámina cribosa) de los mismos.*

### **1.3.1.1. Cambios morfológicos del alveolo postextracción**

La curación de un alveolo tras una extracción dentaria se caracteriza por cambios internos, que conducen a la formación de hueso en el interior del alveolo, y cambios externos que conducen a la pérdida de la anchura y altura de la cresta alveolar (73).

A las *24 horas*, el alveolo se rellena por un coágulo sanguíneo, proceso seguido de una hemólisis y del inicio de un proceso inflamatorio. A los *2-3 días* empieza a tener lugar el reemplazo del coágulo por un tejido de granulación rico en fibras colágenas y vasos sanguíneos. A los *cuatro días* se observa un aumento del número de fibroblastos y empieza a formarse una matriz provisional que reemplaza progresivamente al tejido de granulación. A la *semana* empieza a mineralizarse la matriz y se pueden empezar a observar pequeñas cantidades de tejido

óseo nuevamente formado. (71,73,74)

La finalización de la cicatrización del alveolo se observa clínicamente como el cierre de la entrada del alveolo por un tejido blando epitelizado firme y/o relleno óseo radiográfico del alveolo. Aunque la mayoría de los cambios dimensionales que comprenden la cicatrización del alveolo ocurren durante los primeros 3 meses, la reorganización de la cresta alveolar puede continuar hasta el primer año postextracción (75).

Diversos autores han observado una considerable mayor reabsorción en las paredes vestibulares comparado con las paredes linguales/palatinas desplazándose de este modo el centro de la cresta hacia lingual/palatino. Se sugiere que la diferencia entre la reabsorción de la tabla vestibular (más marcada) y la tabla lingual/palatina está relacionada con (71,74):

- El hueso fasciculado que va a desaparecer (estructura odonto-dependiente que desaparece al faltar el diente) ocupa una mayor parte en la pared vestibular (1-2 mm marginales de la cresta ósea) que en la lingual/palatina.
- La reabsorción de superficie tendrá un efecto más pronunciado sobre la pared vestibular que es más delgada que sobre la pared lingual/palatina del alveolo, que es comparativamente más ancha.

Se debe tener en cuenta que la conservación de las dimensiones originales del alveolo, resulta altamente improbable. Multitud de factores pueden influir en los cambios dimensionales tras la extracción; desde factores sistémicos como la salud general y la genética del paciente o los hábitos (p.ej. tabaco), hasta factores locales como la extensión del trauma inducido durante el proceso de la extracción, las diferentes razones de la extracción, el número y proximidad de los dientes a extraer, la condición del alveolo antes y después de la extracción, el biotipo, las diferentes localizaciones, el tipo de prótesis usada,... (72,73,76)

La magnitud de estos cambios dimensionales es importante para la toma de decisiones en el plan de tratamiento. Muchos han sido los estudios que han cuantificado los cambios dimensionales tras la extracción dental, en la Tabla 2 se recogen los resultados obtenidos en algunos de ellos (75,77-83).

Reducción ósea post-extracción	Anchura (mm) ⇄	Altura (mm) ⇕	T	Detalles del estudio
Lekovic y cols. 1997 (83)	4.43±0.72	1.00±0.00	6	2 ó más dientes zona ant. o prem. Colgajo.
Lekovic y cols. 1998 (82)	4.56±0.33	1.50±0.26	6	2 dientes zona ant. o prem. Colgajo.
Camargo y cols. 2000 (81)	3.06±2.41	1.00±2.25	6	2 dientes zona ant. o prem. Colgajo.
Schropp y cols. 2003 (75)	6.1 (50%)	0.7	12	Unitario molar o prem. Max. o mandib.
Iasella y cols. 2003 (80)	2.63±2.29	0.90±1.60(V)/0.4±1.0(L)	12	1 o 2 dientes no molares. Colgajo.
Barone y cols. 2008 (77)	4.5±0.8	3.6±1.5(V)/3.0±1.6(L)	7	Unitario ant. o prem. Max o mandib. Colgajo.
Van der Weijen y cols. 2009 (79)	3.87	1.67-2.03	3-12	Revisión de la literatura.
Tan y cols. 2012 (78)	3.79±0.23 (29-63%)	1.24±0.11 (11-22%)	6	Revisión de la literatura.

Tabla 2: Resumen de estudios representativos que miden la variación de las dimensiones de la cresta alveolar tras la extracción dental en humanos. Max.: maxilar; mandib.: mandibular; ant.: anterior; prem.: premolar; T: Tiempo (meses).

### 1.3.1.2. Preservación alveolar

Se han propuesto diferentes técnicas para intentar reducir la reabsorción ósea que se produce tras la extracción dental con la intención de mantener un adecuado volumen óseo. La preservación alveolar consiste en la realización de extracciones lo más atraumáticas posibles seguidas de la colocación de biomateriales (injertos óseos y/o membranas barrera) en el alveolo dentario vacío.

Según el consenso de 2012 (84) las indicaciones para los procedimientos de preservación alveolar son:

- Cuando la colocación del implante debe diferirse.
- Cuando hay necesidad de mantener el contorno de la cresta para un tratamiento protésico convencional estético.
- En zonas donde es crítico mantener el volumen óseo (seno maxilar, nervio mentoniano).
- Cuando el coste/beneficio es positivo.

Varios estudios han evaluado el efecto de la colocación de diversos materiales de sustitución ósea en el alveolo durante su cicatrización. Tras comparar la cicatrización de alveolos post-extracción a los que se les dejó sin tratar comparado con los que se les colocó un xenoinjerto particulado de origen bovino Bio-Oss Collagen<sup>®</sup> (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza) se encontraron los siguientes hallazgos a destacar:

- En un estudio en perros se observó a los tres meses que la reabsorción ósea no se inhibe por completo pero la dimensión y el perfil de la cresta alveolar esta mejor conservada tras colocar el material de injerto, lo que parece compensar en cierta medida la reabsorción ósea (85).
- En un estudio clínico controlado randomizado, a los 4 meses se observó una reducción del volumen de alrededor del 25% ( $24,7 \pm 18,8\%$ ) en los alveolos sin tratamiento en comparación con el 3% ( $2,7 \pm 13,5\%$ ) observado en los alveolos preservados (86).

Por tanto parece que cuando se coloca un material de injerto en el alveolo postextracción, los porcentajes de reducción ósea pueden ser disminuidos aunque no evitados por completo (85,86). Esto también se ha observado en varias revisiones sistemáticas de la literatura (87,88) y meta-análisis (89).

Así pues, el injerto limita el colapso de los tejidos blandos en el alveolo y soporta la formación ósea, disminuyendo por un mecanismo compensatorio, la contracción de la cresta ósea tras la extracción (72,90).

Hasta la fecha no hay evidencia de que una determinada técnica de preservación (diferentes materiales de injerto con diferentes propiedades colocados en el alveolo con o sin el empleo concomitante de membranas) sea superior a otra (87–89).

Según la revisión de Vignoletti y cols. de 2012 (87) se observó una reducción en la contracción alveolar de 1,47 mm en altura y de 1,83 mm en anchura cuando se realizaron técnicas de preservación. Según el meta-análisis de Willenbacher y cols. de 2016 en un periodo de seguimiento de  $6 \pm 1$  meses se observó que se pueden preservar entre 1,31 y 1,54 mm en anchura y entre 0,95 y 1,12 mm en altura, realizando técnicas de preservación alveolar en comparación con alveolos sin tratamiento; además a la hora de colocar el implante tras el periodo de cicatrización, un 20,8% de los casos donde se dejó el alveolo cicatrizar sin

tratamiento adicional, necesitaron procedimiento de regeneración ósea, mientras que únicamente los necesitaron un 9,9% de los casos cuando se hizo preservación alveolar (89).

Aunque está técnica ha demostrado reducir la contracción del alveolo post-extracción, se han publicado ciertas desventajas o dificultades. Como la dificultad para el cierre del tejido blando, el aumento del periodo de cicatrización, el coste,... Además hay autores que han cuestionado el uso de biomateriales en el interior de alveolos frescos postextracción debido a que parece que interfieren con el proceso de curación normal (91). Se ha observado histológicamente a los 9 meses tras usar injerto particulado de origen bovino la presencia de un 30,8% de injerto remanente, aunque perfectamente incorporado con el nuevo hueso formado (92). Hay que tener en cuenta también que se debe evitar realizar esta técnica cuando haya infección aguda en la zona o la cirugía esté contraindicada por problemas médicos (73).

Otra opción que se ha propuesto para intentar preservar la cresta alveolar es la colocación de implantes inmediatos en el mismo acto quirúrgico que la exodoncia. Esta técnica es muy sensible al manejo clínico del cirujano y sólo se emplea cuando se puede conseguir una buena estabilidad primaria del implante, pero está bien establecido en la literatura que la colocación inmediata de implantes no previene la reabsorción ósea alveolar (72,93–95).

También se ha propuesto combinar la colocación de implantes inmediatos con el uso de injertos particulados que rellenen el espacio vacío entre el implante y el alveolo dentario. Araújo y cols. en 2011 (96) observaron que colocar injertos junto con el implante inmediato ayuda a reducir la reabsorción de la cresta ósea vestibular y disminuye las posibilidades de recesión de tejidos duros y blandos.

Así pues se puede concluir a este respecto que a pesar de las técnicas de preservación, en muchas ocasiones son necesarios procedimientos de regeneración ósea adicionales, aunque estos son más frecuentes si no se realiza preservación alveolar.

#### 1.4. REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA.

Como ya se ha mencionado el tejido óseo exhibe un considerable potencial de regeneración y restaura perfectamente su estructura original y sus propiedades mecánicas. Sin embargo, esta capacidad tiene limitaciones e incluso puede fracasar en casos con aporte sanguíneo insuficiente, inestabilidad mecánica, defectos demasiado grandes y/o presencia de tejidos competidores con elevada actividad proliferativa. (15)

La reabsorción del proceso alveolar tras infección, trauma, enfermedad periodontal y especialmente subsiguiente a la pérdida del diente, provoca con frecuencia defectos óseos que podrían dificultar la consecución de una rehabilitación oral satisfactoria con implantes dentales (13,14) o provocar una merma en la estética oral del individuo lo que suele requerir una fase de cirugía reconstructiva para regenerar esos defectos óseos.

Actualmente alrededor del 50% de los lechos óseos donde se colocan implantes requieren aumento óseo para permitir una inserción óptima del implante y un adecuado resultado estético (15).

Para resolver esos posibles defectos en el reborde alveolar se han descrito varias técnicas de aumento óseo que se explican brevemente a continuación:

- Los injertos en bloque: permiten trasladar, desde un sitio donante, tejido óseo que es fijado en el sitio receptor mediante tornillos de osteosíntesis. El sitio receptor creará nueva irrigación sanguínea que aportará nutrición al bloque y permitirá su incorporación a la nueva posición.
- La expansión de cresta: en la que mediante instrumental piezoeléctrico (instrumental que permite realizar un corte óseo mediante vibraciones ultrasónicas) o con instrumental rotatorio (fresas de corte de sierra) se genera una corticotomía alveolar que crea una fractura en tallo verde que divide la cresta alveolar longitudinalmente en dos permitiendo separar ambas porciones, creando un espacio que se mantendrá y rellenará, mediante instrumental (expansores ó implantes transicionales) y materiales específicos (implantes ó injertos óseos) y ganando de esta forma anchura ósea.
- La distracción osteogénica: consistente en desplazar de forma gradual segmentos óseos quirúrgicamente creados, permitiendo aumentar el volumen al promover la neoformación ósea, así como conseguir un aumento significativo de los tejidos blandos.

- La regeneración ósea guiada (ROG) la cual se basa en primar el desarrollo del biotipo celular que se pretende regenerar (en este caso el hueso) aislándolo de otros tejidos mediante el uso de membranas barrera (16–18).

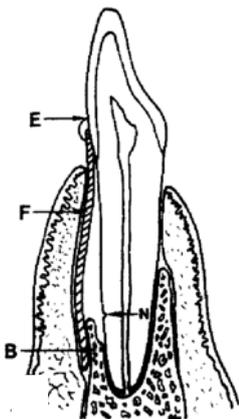
Entre estos métodos la ROG es la técnica mejor documentada y más ampliamente utilizada para el tratamiento de defectos óseos localizados en los maxilares. (97–102)

#### 1.4.1. Desarrollo del concepto de la ROG

El concepto de regeneración ósea guiada (ROG) nace a partir de la regeneración tisular guiada (RTG).

La RTG es un procedimiento que se basa en primar el desarrollo del biotipo celular que se pretende regenerar, aislándolo de otros tejidos no deseados que cuentan con una mayor velocidad proliferativa, haciendo uso para tal fin de membranas barrera (20,103,104).

Los primeros estudios se enfocaron en la regeneración periodontal (Fig. 8).



*Fig. 8: Imagen del artículo “New attachment following surgical treatment of human periodontal disease” de Nyman y cols. de 1982 (103). En este estudio se realizó una cirugía periodontal a un incisivo mandibular con enfermedad periodontal avanzada y una pérdida ósea de 9 mm y se colocó una membrana, la cual previno durante la cicatrización que el tejido epitelial y el tejido conectivo llegasen a contactar con la raíz donde se quería que se formase tejido de inserción (LPO). A los 3 meses se observó una nueva inserción con LPO durante 5 de los 9 mm perdidos. F: filtro, E: esmalte, B: hueso alveolar, N: marca en la superficie radicular a la altura de donde se encontraba inicialmente el hueso alveolar.*

La historia más reciente y relevante de la regeneración tisular guiada comenzó a principios de los años 80 cuando simultáneamente diversos equipos de varios países empezaron a preguntarse cómo podrían influir en la curación natural de la herida periodontal. Por un lado Stüre Nyman y Thorkild Karring en Escandinavia discutieron sobre la idea de aislar los tipos de tejidos; ellos formularon el modelo basándose en investigaciones previas (105–107) que observaban crecimiento óseo en cavidades aisladas. Junto con su alumno Jan Gottlow y

capitaneados por Jan Lindhe, desarrollaron una serie de estudios usando materiales simples (acetato de celulosa, filtros de Millipore,...) para excluir el epitelio. Gracias al éxito de estos estudios de separación tisular selectiva se acuñó el término de “Regeneración Tisular Guiada”. Por otro lado, John Prichard en EEUU, desepitelizaba la encía para limitar su rápida migración y su interferencia con la cicatrización de la herida periodontal; aunque era efectivo, era doloroso y Prichard tuvo la idea de usar papel de oro como barrera para la migración epitelial, pero el papel era difícil de usar clínicamente. En 1982, Prichard discutió la posibilidad de usar el politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) Gore-Tex<sup>®</sup> (W.L. Gore and Associates Inc, Newark, Delaware), ya utilizado para injertos vasculares, extremadamente inerte y biocompatible, como sustituto al papel de oro. (108)

Investigadores de la empresa Gore (Ambruster y Scantlebury) hicieron mejoras en el material para que cumpliera los objetivos requeridos y Prichard fue uno de los primeros en colocarlas clínicamente. La empresa Gore en 1984 invitó a visitar las instalaciones a Nyman y Gottlow y les reveló su material, desarrollo y patente mientras los Escandinavos compartieron sus experimentos que demostraban la eficacia del aislamiento del epitelio. A partir de entonces se desarrollaron técnicas para aplicar las membranas de e-PTFE clínicamente, produciéndose un amplio desarrollo de la RTG. (108)

Desde entonces la investigación no ha cesado en este campo, encontrándose actualmente investigaciones con factores de crecimiento, terapias celulares, impresión individualizada de biomateriales,... con el fin de obtener resultados cada vez más predecibles y tratar casos cada vez más exigentes.

En el caso de que el tejido que se desea regenerar sea el hueso se denomina concretamente regeneración ósea guiada (ROG), término acuñado por Daniel Buser en 1990. Durante la ROG, la membrana barrera crea un espacio aislado que permite que el hueso utilice su enorme capacidad de cicatrización natural sin trastornos y de forma protegida (osteopromoción) (Fig. 9). Histológicamente el estudio de Schenk y cols. de 1994 (109) demostró los beneficios que promovía la membrana en la regeneración ósea (Fig. 10).

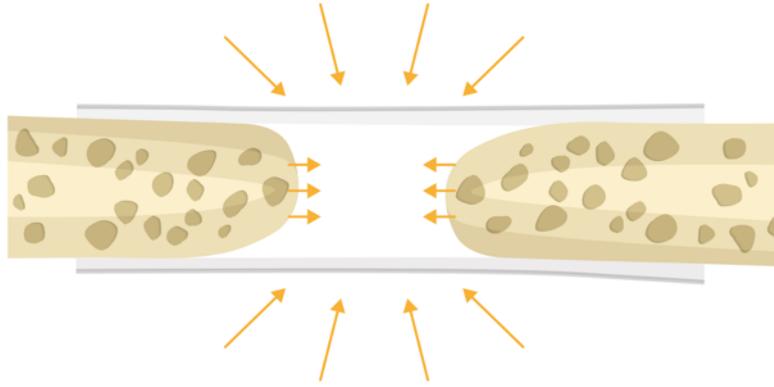


Fig. 9: Imagen esquemática de la Osteopromoción. Se aísla el defecto óseo del resto de tejidos para permitir la llegada de células óseas y de esta manera la regeneración ósea.

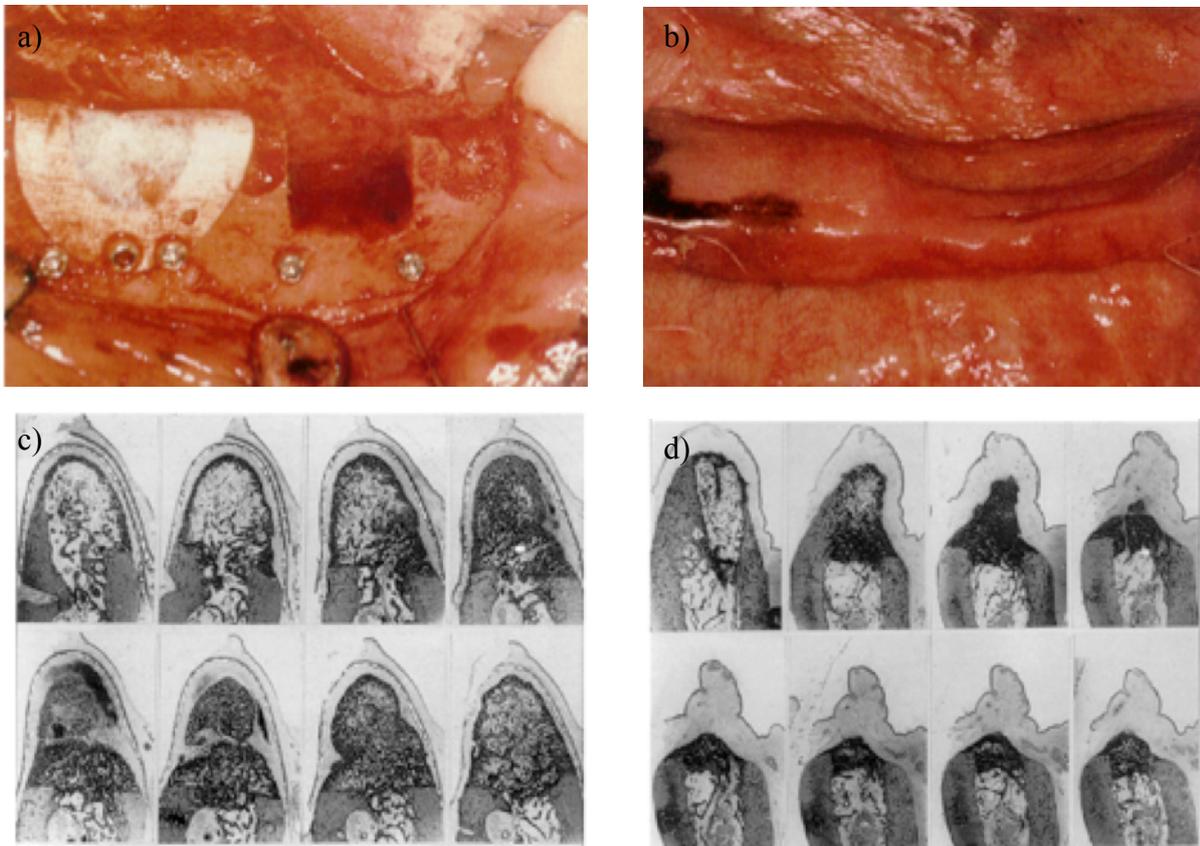


Fig. 10: Imágenes del estudio "Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible" de Schenk y cols. de 1994 (109). a) Foto intraquirúrgica de dos defectos óseos alveolares en perros una cubierto con membrana y otro sin cubrir. b) Estado clínico de la zona a los 4 meses donde se observa un contorno crestal mantenido en la zona que fue tratada con membrana y un colapso en la zona que curó sin la colocación de una membrana. c) Imágenes histológicas de la zona cubierta con membrana donde se observa crecimiento óseo en el espacio mantenido. d) Imágenes histológicas de la zona sin cubrir con membrana donde se observa colapso de tejidos blandos.

### 1.4.2. Mecanismos fisiológicos implicados

Durante la ROG se utilizan diferentes procedimientos y materiales que aíslan el defecto óseo a regenerar de todas aquellas células competidoras, de otros tejidos, que poseen una cicatrización más rápida (epitelio, tejido conectivo) y de esta manera se favorece la cicatrización ósea.

Tras los procedimientos de ROG, durante las primeras 24 horas el espacio creado por el material de injerto-membrana barrera se rellena de coágulo sanguíneo que libera factores de crecimiento y citoquinas para atraer neutrófilos y macrófagos (109–111). El coágulo se reabsorbe y se reemplaza por tejido de granulación rico en vasos sanguíneos neoformados (110,111). A través de esos vasos se transportan nutrientes y células madre mesenquimales capaces de realizar la diferenciación osteogénica y contribuir a la formación del tejido osteoide (110). La mineralización del osteoide forma el tejido óseo inmaduro (109,112), el cual sirve como andamiaje para la aposición de hueso lamelar (Fig. 11) (113). Esta transformación constituirá hueso compacto y esponjoso con médula ósea madura (15,110). Estos eventos ocurren durante 3-4 meses tras la cirugía (15,110).

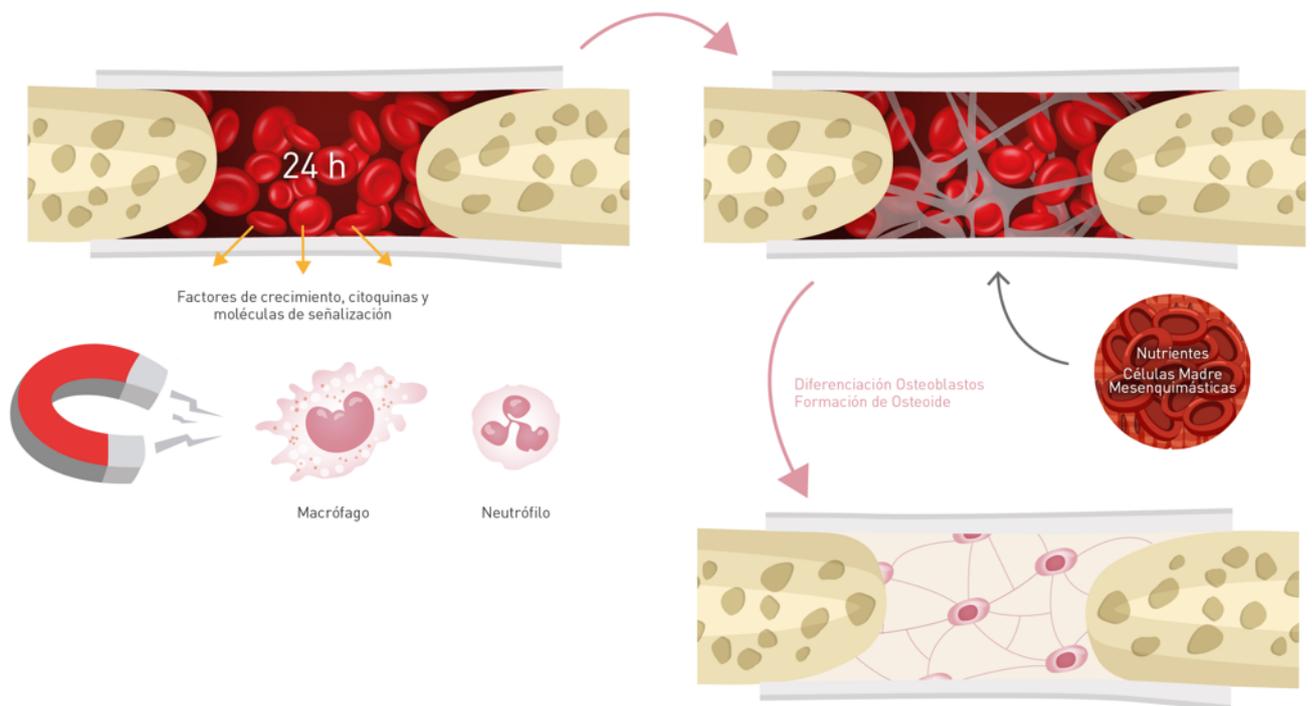


Fig. 11: Esquema de los eventos de la cicatrización tras los procedimientos de ROG.

Por tanto, el desarrollo del nuevo hueso depende de la creación de nuevos vasos sanguíneos que provean de células progenitoras y nutrientes la zona de la regeneración (15,111).

La ROG se ha convertido en un procedimiento altamente exitoso para el aumento en anchura y en altura de los huesos maxilares atróficos (114). En un meta-análisis reciente tras el estudio de 20 artículos que utilizan membrana de colágeno e injerto óseo en procedimientos de regeneración ósea guiada en la zona oral, la ganancia ósea horizontal media fue de  $2.27 \pm 1.68$  mm y la vertical de  $3.05 \pm 1.02$  mm (115).

En el capítulo de “Regeneración ósea guiada. Conceptos y materiales” de Hwang y Sonick (116) se recoge una muestra de estudios que realizan ROG previamente a la colocación de implantes, donde se puede observar un adecuado pronóstico de la ROG con una estimación de aumento medio conseguido de unos 3 mm tanto en dimensión horizontal como vertical (Tabla 3).

Además, en varias revisiones sistemáticas se informa de que las tasas de la supervivencia y éxito de los implantes colocados parcial o totalmente en hueso regenerado, fueron similares (>90%) a las encontradas para los implantes colocados en hueso donde no se realizó regeneración ósea siempre y cuando la regeneración hubiese resultado correcta. (9,11,24–27)

El análisis de la morfología del defecto óseo es la base para decidir qué estrategia terapéutica adoptar y qué materiales utilizar para la ROG. Un mejor entendimiento de los procesos subyacentes de la ROG podría conducir a una nueva generación de productos. Actualmente se investiga para encontrar técnicas que nos permitan tratar con éxito grandes defectos y que promuevan de manera predecible la capacidad natural del cuerpo para regenerar los tejidos perdidos.

Estudios que realizan ROG	P	Membrana	Injerto	$\Delta$ Hor. (mm)	$\Delta$ Vert. (mm)
Buser y cols. 1990 (117)	12	e-PTFE	No	2.5	NE
Chiapasco y cols. 1999 (118)	15	e-PTFE	Autógeno	2.7	NE
Artzi y cols. 2003 (119)	10	Malla de Titanio	ABBM	NE	5.2
Feuille y cols. 2003 (120)	12	e-PTFE	FDBA	NE	3.2
Proussaefs y Lozada 2003 (121)	7	Malla de Titanio	Autógeno + ABBM	3.7	2.9
Proussaefs y Lozada 2003b (122)	7	Colágeno	Autógeno + ABBM	4.5	NE
Proussaefs y Lozada 2006 (123)	17	Malla de Titanio	Autógeno + ABBM	3.8	2.7
Steigmann 2006 (124)	8	Colágeno (Pericardio)	ABBM	3	NE
Geurs y cols. 2008 (125)	38	Reabsorbible	DFDBA	3	NE
Fontana y cols. 2008 (126)	5	e-PTFE (reforzada Ti)	Matriz ósea alogénica	NE	4.7
		e-PTFE (reforzada Ti)	Autógeno	NE	4.1
Pieri y cols. 2008 (127)	16	Malla de Titanio	ABBM	4.2	3.7
Hämmerle y cols. 2008 (128)	12	Colágeno	ABBM	3.7	NE

Tabla 3: Muestra de estudios que realizan ROG propuesta por Hwang y Sonick en el libro “Guided bone regeneration: concepts and materials” (116) que representa el adecuado pronóstico de la ROG, con una estimación de aumento medio conseguido de 3 mm tanto en dimensión horizontal como vertical. P: pacientes.  $\Delta$  Hor.: ganancia ósea horizontal.  $\Delta$  Vert.: ganancia ósea vertical. ABBM: Mineral óseo bovino inorgánico. FDBA: Aloinjerto óseo liofilizado. NE: No Especifica.

### 1.4.3. Materiales para la regeneración ósea guiada

A la hora de realizar la ROG se emplean una serie de materiales con las características y propiedades que citamos a continuación.

#### 1.4.3.1. Membranas

Son indispensables, su función es la de hacer de barrera previniendo la migración de estirpes celulares no deseadas dentro del defecto (129).

En los estudios experimentales y clínicos se ha utilizado una amplia variedad de materiales de membrana para lograr la ROG, entre ellos politetrafluoroetileno (PTFE), politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), colágeno, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y poliuretano, entre otros.

Hardwick y cols. en 1994 (130) formularon ciertos criterios esenciales que debían cumplir las membranas para RTG y que deberíamos exigir también para la ROG:

- “Oclusividad” celular.
- Biocompatibilidad.
- Integración por los tejidos huésped.
- Posibilidades de manipulación clínica.
- Función de crear espacio.

Se entiende que las membranas deberán tener una estructura microporosa para proporcionar una oclusividad selectiva, en la que por una lado se permita el paso de los nutrientes para la formación ósea, pero se impida el paso de células no deseadas hacia la zona de la regeneración. Su éxito se ve influido por diversos factores como la estabilidad de la membrana, la duración de su capacidad para hacer de función de barrera (debería ser al menos el tiempo que tarda el hueso en regenerar), la capacidad de promover un acceso mejorado del tejido que se quiere regenerar previniendo la entrada de células no deseadas, la capacidad de proporcionar estabilidad al coágulo, la prevención de dehiscencias de tejidos blandos, y la llegada de factores que influyan favorablemente en la formación del tejido (97).

Recientemente se ha empezado a estudiar la posible función activa de las membranas en la promoción de la regeneración ósea, más allá de su función pasiva de barrera (102,131,132). En este sentido, algunos estudios defienden que las membranas podrían promover un ambiente de reclutamiento y activación de diferentes tipos celulares en el defecto (131). No obstante todavía no está suficientemente estudiado si diferentes membranas tendrán diferentes potenciales para alojar y activar células reclutadas y si esto resultará en diferentes grados de formación ósea (131).

Finalmente, las membranas pueden clasificarse en reabsorbibles y no reabsorbibles.

### Membranas no reabsorbibles

Ante la presentación del primer procedimiento exitoso de ROG y la amplia y satisfactoria aplicación ulterior de las membranas de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), este material se convirtió rápidamente en el estándar de la regeneración ósea durante los años 80 y 90 (97). Los estudios clínicos y experimentales han mostrado excelentes resultados terapéuticos con las membranas no reabsorbibles (20,21,133,134). Este material resiste a la degradación por los tejidos del huésped y por los microorganismos, y no produce reacciones inmunológicas (97). No obstante, en situaciones en las que se desea formación ósea en defectos grandes o fuera del marco óseo la membrana convencional de e-PTFE no mantiene adecuadamente el espacio a menos que sea sostenida por materiales de relleno o se le añadan a la membrana refuerzos de titanio (97).

La gran desventaja de las membranas no reabsorbibles es la necesidad de un segundo procedimiento quirúrgico para la retirada de la misma. Por otro lado requieren de habilidad quirúrgica, siendo común la aparición de dehiscencias y exposiciones, que además son rápidamente colonizadas por microorganismos, conllevando al fracaso de la técnica (135).

Con la intención de conseguir resultados más predecibles, reduciendo la tasa de complicaciones, facilitando la aplicación de la membrana durante la intervención y reduciendo el número de procedimientos quirúrgicos; se vio la necesidad de desarrollar membranas reabsorbibles.

### Membranas reabsorbibles

Con el uso de membranas reabsorbibles ha disminuido la tasa de dehiscencias (136). Esto es importante ya que una revisión de la literatura reciente ha observado que cuando no hay exposición de membrana hay un 74% más de aumento óseo horizontal en zonas edéntulas y un 27% más de reducción del defecto peri-implante comparado con zonas con exposición de membrana (137).

Las membranas reabsorbibles y biodegradables deben cumplir criterios adicionales: las reacciones tisulares resultantes de la reabsorción de la membrana deben ser mínimas, reversibles y no deben influir negativamente en la regeneración de los tejidos deseados (104).

Actualmente, se emplean principalmente dos materiales: polímeros sintéticos como poliglicoles, ácidos polilácticos o sus copolímeros y polímeros naturales como el colágeno. Estos materiales son más fáciles de manejar, presentan una menor tasa de complicaciones y además, no necesitan un segundo acto quirúrgico para su retirada.

Los materiales de barrera de ácido poliláctico y ácido poliglicólico han sido evaluados en numerosos estudios; estos materiales son biocompatibles, pero por definición no son inertes y se ha descrito alguna reacción tisular durante su degradación como inflamación o reacción a cuerpo extraño (135,138).

Las membranas de colágeno son generalmente de origen bovino o porcino, su manipulación es sencilla y no han mostrado una interacción negativa con los tejidos. Se consideran, por tanto, la opción ideal (110) aunque tienen propiedades mecánicas desfavorables y sufren una rápida degradación lo cual, en determinadas circunstancias, podría comprometer el resultado de la regeneración (131).

Aunque es un evento menos frecuente que con las membranas no reabsorbibles, si hay exposición con estas membranas, se observa una cicatrización espontánea con una rápida degradación de las mismas (136), disminuyendo la función barrera y la capacidad de crear y mantener el espacio.

En cuanto a la duración de estas membranas, se han introducido varios métodos (cross-link, doble capa,..) para retrasar la degradación de las mismas y por tanto aumentar el tiempo que realizan de forma efectiva la función barrera.

Por otro lado, debido a sus propiedades mecánicas desfavorables, no son capaces por sí mismas de mantener adecuadamente el espacio, por lo que se precisan materiales de soporte para prevenir el colapso y el consiguiente fracaso de la regeneración (131,135). Haney y cols. en 1993 (139) observaron una correlación muy significativa entre el espacio provisto por la membrana y la cantidad de hueso alveolar regenerado en un modelo de defecto alveolar en perros. En este sentido, el uso de injertos particulados como materiales de soporte junto con membranas reabsorbibles, pueden resultar una combinación eficaz, de manera que los estudios muestran unos resultados en ROG comparables a los obtenidos con membranas de PTFE (136,140,141).

En definitiva las membranas reabsorbibles generalmente muestran un adecuado comportamiento clínico con un menor índice de complicaciones que las membranas no

reabsorbibles (97); de manera que, a menos que la morfología del defecto u otros factores impidan su uso, estas membranas resultan de primera elección.

#### **1.4.3.2. Injertos óseos**

Los injertos óseos son ampliamente utilizados, de hecho constituyen el segundo tipo de trasplante de tejido más frecuente en todo el mundo, justo después del de sangre (142,143). Se estima que se realizan en el mundo 2,2 millones de procedimientos de injerto óseo al año (142,143). Aunque se han considerado diferentes funciones para los injertos óseos, en la actualidad se cree que el papel esencial que desempeñan es el del mantenimiento del espacio (23,144).

En síntesis, los materiales de relleno pueden servir para varios propósitos durante los procedimientos de ROG (22):

- Soporte de la membrana para evitar el colapso de la misma.
- Estabilizar el coágulo de sangre.
- Entramado para la invasión de tejido óseo desde el lecho receptor.
- Protección mecánica frente a la presión de los tejidos blandos suprayacentes.
- Protección del volumen aumentado frente a la reabsorción.

El material de relleno óseo ha de ser al menos (15):

- Seguro
- No tóxico
- Biocompatible
- Ofrecer soporte mecánico
- Ofrecer un entramado osteoconductor
- Osteointegrarse o reemplazarse
- Permitir la entrada de vasos sanguíneos y células
- Ser fácil de utilizar
- Ser rentable

Además idealmente será radio-opaco, hidrofílico y deberá proveer una adecuada manejabilidad.

El material de injerto funciona por tanto, como un andamiaje para las células invasoras del huésped (37). Los OBs y osteocitos del hueso circundante no tienen la habilidad de migrar y dividirse lo que significa que el material es invadido por células mesenquimales que después se diferencian en OBs (37,42). La unión de células madre mesenquimales y osteoprogenitoras inicia la formación de hueso en los sustitutos óseos. Por lo tanto, el material utilizado debería permitir la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales y osteoprogenitoras en el sitio trasplantado, permitiendo el depósito y la mineralización de matriz extracelular por las células osteoblásticas.

Los injertos óseos generalmente están disponibles en forma de bloques o gránulos/partículas. A pesar de que los injertos en bloque proporcionan mayor estabilidad mecánica siempre y cuando se inmovilicen con tornillos de fijación, los injertos óseos particulados se suelen preferir a los bloques ya que además de proporcionar una mayor conformabilidad en el defecto (145,146), se espera que se produzca una mayor revascularización alrededor de las partículas; además, el área de superficie total de las partículas es mucho mayor que en el injerto en bloque (147). Los injertos óseos además, pueden ser esponjosos, corticales o corticoesponjosos y según su origen; se dividen en: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y materiales de origen sintético o injertos aloplásticos; para los cuales se han descrito diferentes propiedades osteogénicas, osteoinductivas u osteoconductivas.

#### Propiedades de los injertos en el contexto de la ROG:

Los diferentes materiales utilizados pueden actuar por al menos uno de estos tres mecanismos descritos para promover la regeneración ósea (Fig. 12):

- *Osteoconducción:* Es la capacidad del injerto de crear un soporte estructural para la neoformación ósea. El injerto sirve de guía o matriz para la penetración de vasos y células osteoprogenitoras desde la zona receptora.
- *Osteoinducción:* Es la capacidad de un tejido para inducir a las células mesenquimales a migrar desde la periferia del defecto y a diferenciarse hacia el linaje celular osteoblástico estimulando así la neoformación ósea.

- *Osteogénesis*: Propiedad para regenerarse o producir hueso nuevo por sí mismo debido a las células óseas vivas que contiene. Estas células que han sido trasplantadas de una parte a otra del organismo establecen centros de formación y crecimiento óseo. Propiedad que corresponde a los injertos de hueso autólogo.

Estas tres propiedades junto con la osteointegración (unión final entre el huésped y el material de injerto) son esenciales para la regeneración ósea (143).

El injerto óseo ideal debería cumplir todas estas propiedades además de ser biocompatible y proporcionar estabilidad mecánica. (143)

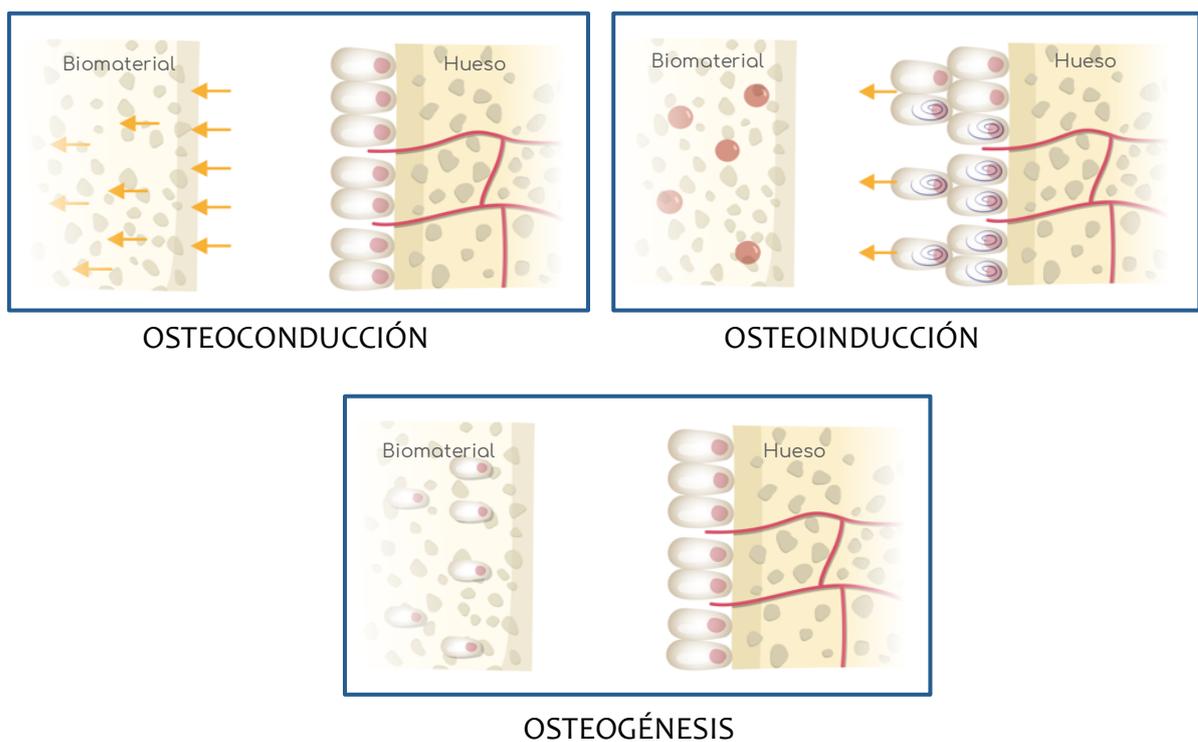


Fig. 12: Gráfico que representa las tres propiedades esenciales para la formación ósea.

### Tipos de injertos

Atendiendo a su origen, los diferentes materiales de injerto empleados durante las técnicas de ROG se pueden clasificar en:

#### *- Autoinjertos o injertos autógenos.*

Es un tejido que se transfiere de una posición a otra dentro del mismo individuo; se obtienen de un determinado sitio denominado sitio donante y son implantados en un lecho receptor.

Al transportar el hueso autógeno, hay factores de crecimiento y células osteogénicas viables que promoverán la neoangiogénesis y la neoformación ósea, aunque estas células y factores de crecimiento se encontrarán en diferente cantidad y concentraciones en función del individuo, la localización y la forma de recogida del injerto. Los autoinjertos se consideran el “gold estándar” ya que son los únicos que poseen todas las propiedades esenciales para la formación ósea (proveen osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis) sin asociarse riesgo inmunológico o infeccioso.

Este tipo de injertos pueden recogerse en bloque o en partículas mediante pieza de mano a alta o baja velocidad, cinceles, trefinas, instrumentos piezoeléctricos, gubia, rascadores óseos, molinillos óseos,.. de las zonas donantes (110). Con las diferentes técnicas de recogida de injerto, se obtendrán diferentes tamaños de partícula (110,148) y diferente número y actividad de las células trasplantadas (148) lo que influirá en los resultados de la regeneración ósea. Se puede obtener tanto de zonas extraorales (cresta ilíaca, tibia, peroné, calota) como intraorales (mentón, cuerpo o rama mandibular, espina nasal, tuberosidad maxilar, cuerpo cigomático) (22,149).

Las células osteogénicas son más numerosas en el hueso trabecular que en el compacto y tienen mayor potencial en individuos jóvenes que en pacientes de edad avanzada. El hueso esponjoso tiene mayor celularidad pero debido al menor contenido mineral tiene menos BMPs (factor osteoinductor) que el cortical; a su vez el hueso esponjoso presenta una mayor tasa de revascularización. (22)

El injerto particulado (comparado con el bloque), por la mayor área de superficie, tendrá mayor exposición de factores de crecimiento y en general es más osteogénico aunque esto último dependerá de la manipulación; también su tasa de reabsorción es mayor (Tabla 4) (22).

Autoinjertos	Células Osteógenas	Factores de crecimiento	Estabilidad mecánica	Reabsorción
Bloque cortical	++	++++	+++++	+
Bloque cortico-esponjoso	++++	+++	++++	++
Partículas corticales	+	+++	+++	+++
Partículas esponjosas	+++	++	++	++++
Hueso de raspador	+	++	++	++++
Hueso de recolector	+	+	+	+++++

Tabla 4: Características de los autoinjertos. Adaptado del capítulo de Jensen SS, Bosshardt DD y Buser D en el libro “20 años de regeneración ósea guiada en implantología oral” (22).

Se ha descrito una tasa de complicaciones tras la recogida del hueso autógeno de entre el 8,5 y el 20%, entre ellas: inflamación, hematoma, dolor, dehiscencia de la herida, hemorragia profusa y continua, infección, sensibilidad alterada (dientes, mucosa o piel),... (143). Esto, unido a sus inconvenientes (reabsorción considerable y no previsible, morbilidad de la zona donante, aumento del tiempo quirúrgico y cantidad limitada de tejido) ha intensificado la búsqueda de alternativas (22,149).

- Aloinjertos o injertos homólogos.

El aloinjerto es un injerto que se transfiere entre miembros de la misma especie. El hueso del aloinjerto se puede recolectar de donantes vivos (comúnmente durante la cirugía de reemplazo total de cadera) o de donantes no vivos (huesos largos, hemipelvis, crestas iliacas,...) y se debe procesar dentro de un banco de tejido óseo (142).

El banco de hueso se define como la Institución o unidad técnica encargada de la obtención, procesamiento, preservación y almacenamiento de tejidos óseos humanos con vistas a su distribución como aloinjertos para aplicación clínica. El aloinjerto es osteoconductor y débilmente osteoinductor (los factores de crecimiento aún pueden estar presentes, dependiendo del procesado) (142). En EEUU su uso está muy extendido siendo la alternativa al hueso autógeno más frecuentemente utilizada (150), mientras que en Europa, debido a normativas locales, su uso no es tan habitual en clínica (22).

Entre los aloinjertos, están:

1. El hueso fresco congelado; debido al riesgo de reacciones inmunológicas y transmisión de enfermedades su uso es muy limitado (143).
2. El aloinjerto de hueso liofilizado (FDBA).
3. El aloinjerto de hueso liofilizado desmineralizado (DFDBA).

Estos aloinjertos se presentan en bloques o en forma de partículas, tanto de origen cortical como esponjoso. La liofilización es un proceso de deshidratación en el que se congela el producto (-70°C) y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación (de agua sólida a gas) hasta conseguir menos de un 5% de agua, permitiendo el almacenamiento de estos materiales a temperatura ambiente. Al liofilizar se reduce marcadamente el riesgo de transmisión de enfermedades (no se ha publicado la transmisión de enfermedades con el uso de aloinjertos liofilizados) pero también se reduce la resistencia mecánica del injerto.

Aunque el FDBA tiene el mismo contenido en BMPs en su matriz orgánica que el DFDBA, no tiene una capacidad osteoinductiva inmediata. Las BMPs permanecen atrapadas en las partículas minerales. Cuando el FDBA se usa como material de injerto, los OCs rompen el contenido mineral hasta que el FDBA es también desmineralizado y es entonces cuando las proteínas osteoinductivas pueden estar disponibles para inducir neoformación ósea. Por su parte, el DFDBA, no requiere el proceso de desmineralización osteoclástica inicial, y las proteínas osteoinductivas solubles pueden funcionar directamente tras la implantación. Esa es la razón por la que se desmineraliza, para facilitar la liberación de las BMPs mientras se retiene una pequeña porción de calcio para que actúe como nido para la formación de cristales de HA (Fig. 13) (22,110,151). El DFDBA muestra mayor tasa de reabsorción y menor estabilidad volumétrica

(152) por lo que suele usarse en combinación con otros materiales que mantengan el espacio si se emplean en defectos óseos que no son autocontenidos. El FDDBA se reabsorbe lentamente, puede proveer un mejor andamiaje que el DFDBA para el mantenimiento de espacio y es mejor osteoconductor (153,154).



*Fig. 13: Representación de las propiedades de FDDBA y DFDBA en función del porcentaje de mineralización. Se representa cómo un aloinjerto con un mayor porcentaje de mineralización proporciona un mayor soporte estructural pero una menor capacidad osteoinductiva inmediata (BMPs atrapadas en las partículas minerales). Una amplia desmineralización conservando un pequeño porcentaje de calcio residual nos podría permitir obtener un buen potencial osteoinductivo además de una base para la formación de cristales de HA.*

Los procesos de esterilización del tejido de aloinjerto (irradiación, agentes químicos,..) disminuyen el riesgo de transmitir enfermedades, pero puede debilitar significativamente las propiedades biológicas y mecánicas presentes inicialmente en el tejido óseo (143).

Es importante mencionar que diferentes tipos de aloinjerto muestran diferentes comportamientos clínicos e histológicos; esto está influido por su procesado y composición (155). También se ha teorizado acerca de la influencia en la capacidad osteoinductiva en función de la edad del donante, siendo esta mayor cuando el donante es más joven (110,151,156). Existe una amplia variación en la capacidad osteoinductiva de los aloinjertos que se comercializan, incluso dentro del mismo banco de hueso (110,157,158).

Los límites de estos materiales son: los costos, el procedimiento laborioso necesario para su obtención (recolección y procesamiento de tejidos), la menor resistencia mecánica (disminuye

tras la liofilización e irradiación), una osteoinducción limitada, el riesgo de infección y la falta de aceptación por parte del paciente (142).

- Xenoinjertos o injertos heterólogos.

Los xenoinjertos son materiales de injerto óseo que provienen de especies diferentes a la del individuo receptor. Pueden ser de origen animal o derivados de corales o algas calcificantes. Son básicamente osteoconductores.

Los materiales derivados de corales y algas tienen en general una geometría similar a la del hueso esponjoso humano pero los estudios experimentales con hueso coralino mostraron un menor poder osteoconductor comparado con el de otros sustitutos óseos y se han encontrado complicaciones como encapsulación y dehiscencias tardías (22,159). El material proveniente de las algas contenía un tamaño de poro inapropiado para la penetración vascular (160).

En cuanto a los materiales óseos derivados de animales, se han utilizado de diferentes orígenes, pero principalmente el bovino. El hueso bovino disponible comercialmente se procesa para obtener mineral óseo, fundamentalmente hidroxiapatita, retirando el componente orgánico mediante tratamiento con calor y/o tratamiento químico para eliminar el riesgo de reacciones inmunológicas y de transmisión de enfermedades (22). Los métodos de producción (tratamiento con altas temperaturas, sinterizado,...) tienen una enorme repercusión en su comportamiento biológico (22). Estos materiales presentan gran similitud con el hueso humano, demostrando una arquitectura y ratio calcio-fosfato similar al hueso mineral humano (110,149).

El injerto óseo bovino inorgánico (ABBM) es el biomaterial más documentado y ampliamente utilizado, demostrando ser efectivo para la ROG, proporcionando suficiente hueso nuevo regenerado así como altas tasas de supervivencia de los implantes colocados (115,161). Ha sido recomendado como primera elección en elevación de seno o para ensanchar la cresta alveolar con resultados similares al injerto de hueso autólogo (115,161). Este material presenta una buena osteoconductividad debido a la preservación de la estructura natural y ha demostrado una adecuada integración histológica junto con una adecuada neoformación ósea y vascularización en numerosos estudios experimentales y clínicos.

Dado que es de reabsorción lenta, mantiene el volumen de forma muy estable. Con el tiempo el ABBM se integra con el hueso humano y es lentamente reemplazado por tejido óseo

nuevamente formado. Sin embargo, el tiempo de remodelado y reemplazo es largo; de hecho, hay controversias en cuanto al ratio de reabsorción de estos materiales (162,163). El bajo ratio de reabsorción podría tener un impacto negativo en la cicatrización de la zona injertada y comprometer las propiedades mecánicas y biológicas de la zona regenerada (110).

Estos materiales están disponibles en diferentes tamaños de partículas, en forma de geles, pastas o como injertos en bloque, y pueden ser de hueso cortical y/o esponjoso. Tienen la ventaja de tener una larga vida útil, ser costo-efectivos, osteoconductores eficaces, ofrecer una gran disponibilidad y sin restricciones de tamaño (164).

- Injertos aloplásticos o sintéticos.

Se trata de injertos óseos constituidos con materiales de origen sintético, sustancias que han sido procesadas para su uso clínico en regeneración ósea. La gran ventaja de los sustitutos óseos aloplásticos es que no conllevan riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas. Son osteoconductores y existe una disponibilidad ilimitada. En la actualidad puede controlarse la composición química de estos materiales; pudiendo optimizarse el tamaño y la interconectividad de los poros, el tamaño de los cristales, la morfología de los bloques o los gránulos,... (22). Se han conseguido grandes avances en el rendimiento biológico de estos materiales y se han mejorado los métodos técnicos de producción. Sin embargo aún no se ha conseguido fabricar un biomaterial que cumpla todas las características de un sustituto óseo ideal (165).

Los materiales empleados para la fabricación de injertos óseos sintéticos son un grupo grande y heterogéneo de materiales que pueden clasificarse en: fosfatos de calcio, vidrios bioactivos y polímeros. Entre ellos los más estudiados son los fosfatos de calcio, concretamente la HA [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; Ca/P=1,67] y el  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; Ca/P=1,5] siendo éstos los únicos suficientemente evaluados clínicamente como sustitutos óseos (145). La HA cristalina del  $\beta$ -fosfato tricálcico tiene una estequiometría similar a la de los precursores óseos amorfos (142,143). La HA se considera no reabsorbible o si es porosa lentamente reabsorbible, mientras que el  $\beta$ -TCP se reabsorbe rápido y se reemplaza gradualmente por hueso (166). Lo que habitualmente se usa es una mezcla de ambos materiales en diferentes proporciones (HA/ $\beta$ -TCP) para aprovechar las propiedades estables de mantenimiento del espacio de la HA y las ventajas de la rápida reabsorción del  $\beta$ -TCP (167). Estos materiales están

disponibles en forma de bloques, de gránulos, de geles o de pastas inyectables. La biocompatibilidad de estos fosfatos de calcio deriva de su composición química, contiene iones comúnmente encontrados en el ambiente fisiológico (calcio, fosfato, magnesio, sodio, etc).

Una de las opciones quirúrgicas emergentes más prometedoras puede ser el uso de un "injerto compuesto" que contiene células osteogénicas y/o factores de crecimiento osteoinductivos (BMPs) junto con una matriz osteoconductora sintética (143). Estas matrices sintéticas se han utilizado solas o en combinación con BMPs o células madre de la médula ósea del paciente. Jung y cols. en 2008 en un estudio animal (168) mostraron una mayor formación ósea al añadir proteína morfogenética ósea recombinante humana-2 (rhBMP-2) al injerto óseo sintético. Park y cols. en 2016 en un estudio animal (169) también observaron un aumento significativo en la formación ósea con el uso de injerto óseo sintético junto con rhBMP-2 en comparación con injerto sintético sólo.

#### Reabsorción de los injertos óseos:

Los biomateriales de injerto óseo pueden degradarse de una manera similar a la hidrólisis cuando los OCs secretan iones de hidrógeno (resistencia ácida del biomaterial) o por disolución química o enzimática. La composición química, solubilidad, tamaño, porosidad y la integridad y cristalinidad de estos biomateriales influirá en su bioreabsorción (145).

Idealmente los injertos deben degradarse gradualmente en el tiempo hasta que son completamente reemplazados por nuevo hueso vital; se acepta que un sustituto óseo óptimo es aquel que mantiene la estabilidad mecánica y el volumen durante la cicatrización inicial y luego se reabsorbe por completo (145,170,171). El ratio de reabsorción debe estar emparejado con el de formación de nuevo hueso ya que una degradación muy rápida del biomaterial puede tener efectos negativos en el proceso de regeneración ósea por un inadecuado mantenimiento del volumen, pero la presencia de biomaterial residual tras la cicatrización ósea llevará a la formación de un "tejido de reparación" más que a un tejido óseo regenerado.

Parece haber una relación inversa entre la reabsorción del injerto óseo y su capacidad de mantenimiento del volumen. La presencia de material residual ayuda a mantener el volumen y podría ser interesante si únicamente se persigue tal objetivo (por ejemplo, por estética como apoyo para el tejido blando), pero demuestra un efecto negativo en las propiedades fisiológicas

del nuevo tejido. El sustituto óseo ideal que se reabsorbería por completo en combinación con un adecuado mantenimiento del volumen durante la regeneración ósea aún no existe (Fig. 14). (145)

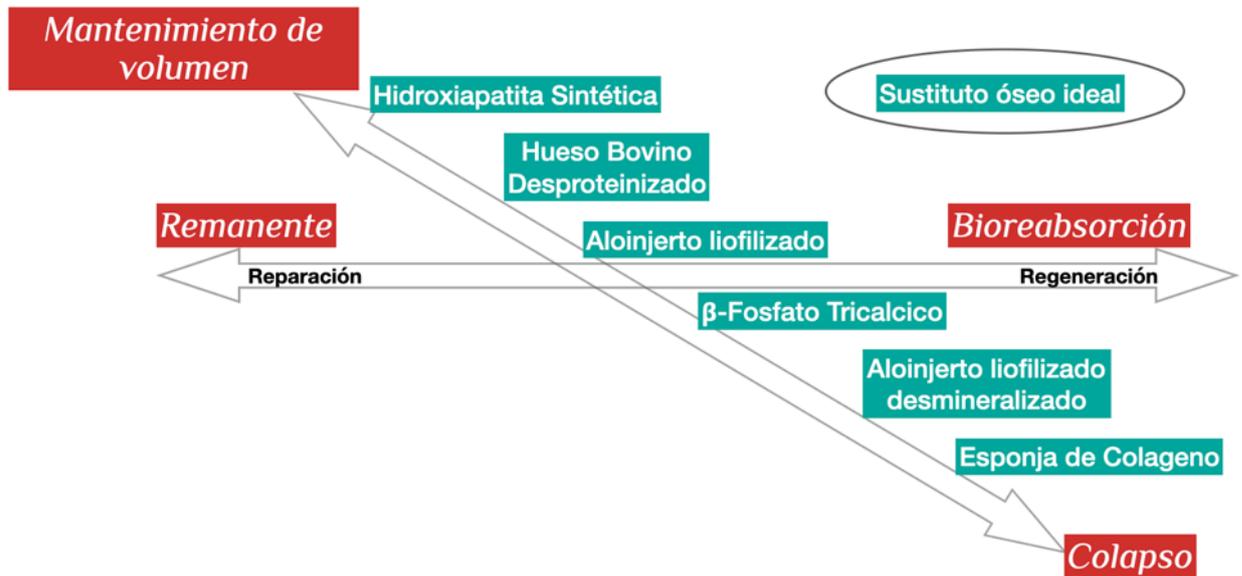


Fig. 14: Asociación entre la bioreabsorción y el mantenimiento del volumen de los injertos óseos. Los sustitutos óseos disponibles en la actualidad exhiben una relación inversa entre ambas propiedades. Adaptación del artículo “Current bone substitutes for implant dentistry” de Yamada M y Egusa H de 2018 (145).

En la siguiente tabla (Tabla 5) se resumen las propiedades de los diferentes materiales de injerto:

Biomaterial	Osteoconductor	Osteoinductor	Osteogénico	Reabsorción
Autógeno	Sí	Sí	Sí	++++*
Alogénico	Sí	Sí <sup>§</sup>	No	+++ (DFDBA>FDBA)
Xenogénico (bovino)	Sí	No	No	+ <sup>¥</sup>
HA/ β-TCP	Sí	No	No	++

Tabla 5: Resumen de las propiedades de los materiales de injerto óseo según su origen. Adaptación del capítulo “Guided bone regeneration: concepts and materials” de Hwang y Sonick (116). \*En función del tipo de injerto autógeno (ver Tabla 4).<sup>¥</sup>En función de las técnicas de procesamiento de cada biomaterial.<sup>§</sup>En función de la composición y las técnicas de procesamiento de cada biomaterial.

### Características morfológicas de los injertos óseos:

El origen, la arquitectura y la composición, así como los métodos de procesado de los sustitutos óseos pueden causar diferencias en las diversas propiedades fisicoquímicas (estructura química, fase mineral, cristalinidad,...) pudiendo influir éstas en los resultados del material, al afectar a su manejo, a las propiedades mecánicas o al potencial regenerativo (172,173). Entre las características físicas que más se investigan están el tamaño de partícula y la porosidad de los biomateriales en función de las cuales, entre otras cosas, se establece su capacidad de reabsorción y posterior sustitución por tejido óseo neoformado.

La formación ósea requiere que el material de injerto sea poroso para permitir la migración y proliferación de células madre osteogénicas, la invasión y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos así como la aposición de matriz osteoide (10,15,174–178). Los poros actúan como vías o paso para el transporte de células y nutrientes; a mayor tamaño de poro, mayor cantidad de oxígeno y nutrientes pueden ser transportados (173,176,179). Una alta porosidad (porcentaje de huecos en un sólido) y un amplio tamaño del poro mejoran por tanto el crecimiento óseo y la osteointegración (175–181); además, una superficie porosa mejora la unión mecánica (interdigitación) entre el biomaterial injertado y el hueso natural circundante proporcionando una mayor estabilidad mecánica a esta interfaz crítica (174,176,178). También se ha observado que la presencia de poros acelera la biodegradación del material al aumentar el área de contacto con los fluidos corporales (176,178).

Aunque se cumple que al disminuir el tamaño del poro se obtiene una mayor área de superficie para la adhesión celular (173,178,182), si el poro es demasiado pequeño se limita la posibilidad de movimiento de las células y se crea una mayor resistencia del biomaterial a la penetración celular y vascular (183), resultando en ocasiones en encapsulación del injerto o zonas necróticas en el mismo por la limitación en la difusión de oxígeno, nutrientes y sustancias de desecho (173). Cuando las células migran a través de la red porosa, usan mecanismos de puente mediante los cuales utilizan a sus células vecinas como puente para atravesar los poros (184). Si las células viajan a través de poros grandes pueden migrar más despacio pero su movimiento en diferentes direcciones les permite viajar más lejos en el andamiaje (173). Sin embargo, si el tamaño del poro es demasiado grande y excede ampliamente las dimensiones de la célula, ésta puede solamente extenderse a lo largo de la partícula y eso puede influir en el resultado de la migración celular (173,185).

En general, los andamiajes provistos por el injerto, deben tener suficiente resistencia para mantener la integridad hasta que el nuevo tejido se regenere, por lo que es importante que las propiedades de estos andamiajes iguallen a las del tejido nativo in vivo para que sean capaces de soportar las cargas fisiológicas (178). La porosidad y el tamaño de poro afectan a la resistencia mecánica y solubilidad del material y finalmente al mantenimiento de la estabilidad estructural del injerto (145,173,176,178); en ese sentido, se tiende a limitar la cantidad y tamaño de poros que se pueden incorporar en un andamiaje para no comprometer en gran medida sus propiedades mecánicas (173,176,178). Por lo tanto, en el diseño de la arquitectura del andamiaje, debe haber un buen balance entre un alto grado de porosidad y una estabilidad mecánica del material para mantener su integridad hasta que se produzca la regeneración tisular.

Se considera que el andamiaje ideal provisto por el material de injerto óseo, necesita exhibir porosidad en diferentes escalas de tamaños: nanoporos para permitir el transporte molecular esencial para la nutrición, la eliminación de desechos y la señalización; microporos para asegurar la migración celular y la formación de capilares y poros de anchura milimétrica para permitir el desarrollo de nervios y vasos sanguíneos (186). De hecho, diferentes tipos celulares exhiben preferencia para adherirse a andamiajes con diferentes tamaños de poro debido al tamaño propio de cada célula (173,178,187). Los OBs parece que son sensibles a la morfología del material al que se adhieren observándose mayor migración, adherencia y proliferación en presencia de poros de 200-400  $\mu\text{m}$  (177). Se ha observado que un tamaño de poro mayor de 100 micras es necesario para una adecuada migración celular siendo los espacios mayores de 300 micras recomendados para mejorar la formación de nuevo hueso y capilares (176-178). Se sugiere por tanto que el espacio vacío ideal para la osificación intramembranosa debe tener al menos el tamaño de una osteona (200-250  $\mu\text{m}$ ) (176,188,189). Aunque existe gran variación entre los estudios, en general los investigadores recomiendan una porosidad por encima del 50% y un tamaño de poro medio de entre 200 y 800  $\mu\text{m}$  como el óptimo para el crecimiento del tejido óseo (176,177,190).

Otro factor importante que determina la efectividad de la porosidad de un material es la estructura de los poros con respecto a otros dentro de los andamiajes, ya que los poros deben estar interconectados (145,173,175,191). La interconectividad de los poros también juega un papel importante en la invasión celular, el número y tamaño de vasos sanguíneos formados, el flujo de oxígeno y nutrientes, y la formación del tejido óseo (173,175,180,192,193).

También se ha descrito la influencia del tamaño y la forma de las partículas en el fenómeno

de reabsorción y reemplazo, así como su influencia en el espacio interparticular (166,194). Se observa que un material con mayor tamaño de partícula, resulta en mayores espacios entre las partículas y se sugiere que esos espacios formados entre las partículas podrían comportarse de forma similar a los poros (macroporos) en cuanto a la migración de células e infiltración de elementos vasculares en el andamiaje (166,194). Hay una amplia variación en los tamaños de partícula empleados y aún se desconoce cuál es el tamaño ideal (Tabla 6). En general, parece que partículas de mayor tamaño son más resistentes mecánicamente y tienen una mejor capacidad de mantener el volumen (145,195), mientras que las partículas pequeñas son más fáciles de adaptar en el defecto y preferibles si los defectos a regenerar son pequeños. Por otro lado, se ha sugerido que las partículas de tamaño demasiado grande se reabsorberán a un ritmo más lento y ofrecerán un área superficial general reducida; mientras que las partículas de tamaño demasiado pequeño pueden inducir inflamación, reabsorberse fácilmente o dar como resultado un espacio interparticular de un tamaño reducido que no sería propicio para la migración y crecimiento celular (166). Algunos autores recomiendan utilizar una mezcla de partículas pequeñas y grandes para producir un espacio interparticular adecuado con una adecuada distribución y relación entre las partículas (31).

En resumen, podemos concluir que los biomateriales de injerto forman un volumen hueco (espacio interparticular e intraparticular o porosidad) que es esencial para que los capilares y las células perivasculares puedan formarse y migrar con facilidad, dentro de esos pequeños espacios provistos por el material de sostén, luego los OBs podrán poblar los espacios y producir hueso nuevo.

Autor y año	Tipo de estudio	n	Tipo de injerto	Int	Tamaño de partícula	Resultados
Pallesen y cols. 2002 (147)	Animal (conejo)	15	Autógeno (conejo)	Defectos en Calota.	Grande: (10 mm <sup>3</sup> ) Vs Pequeña: (0,5-2 mm <sup>3</sup> ).	Mayor cantidad de formación de nuevo hueso en P a las 2 y 4 sem.
Xu y cols. 2003 (196)	Animal (conejo)	18	Xenoinjerto (conejo)	Elevación de seno.	Grande: (850 a 1000 µm) Vs Pequeña: (300 a 500 µm).	En P el nuevo hueso muestra muchas interconexiones y el área de hueso fue significativamente mayor que en G.
Carneiro y cols. 2005 (197)	Animal (conejo)	24	Xenoinjerto (Gen-Ox)	Defectos en fémur.	Grande: (1.0 a 2.0 mm) Vs Pequeña: (0.25 a 1 mm).	No hay diferencias entre P y G durante toda la cicatrización.
Malinin y cols. 2007 (198)	Animal (mono)	38	Aloinjerto: FDDBA cortical	Defectos en fémur y tibia.	1-2 mm; 500-800 µm; 300-500 µm; 90-300 µm; 125-250 µm; 106-125 µm; 75-106 µm; 25-75 µm.	Las partículas < 100 µm tienen muy disminuido el potencial osteogénico, la cicatrización de los defectos con partículas más grandes de 300 µm fue más lenta. Se observan beneficios en la cicatrización con el uso de partículas de 90-300 µm.
Kon y cols. 2009 (199)	Animal (conejo)	24	Autógeno (tibia)	Defectos en Calota.	Grande: (1-2 mm) Vs. Pequeña (150-400 µm).	El volumen óseo disminuyó de forma significativa 51,3% en P mientras que en G aumentó y se mantuvo.
Zhou y cols. 2011 (200)	Animal (conejo)	12	Xenoinjerto (conejo)	Defectos en Calota.	Grande: (850 a 1000 µm) Vs Pequeña: (300 a 500 µm).	En (G) mayor densidad del hueso formado, espacio entre partículas y longitud de contacto hueso-partícula que en el grupo P.
Chackartchi y cols. 2011 (201)	Humano	10	Xenoinjerto (Bio-Oss)	Elevación de seno.	Grande: (1.0 a 2.0 mm) Vs Pequeña: (0.25 a 1 mm).	No diferencias en porcentaje de injerto residual, ni en ganancia de volumen óseo.
Testori y cols. 2013 (202)	Humano	11	Xenoinjerto (Bio-Oss)	Elevación de seno.	Grande: (1.0 a 2.0 mm) Vs Pequeña: (0.25 a 1 mm).	Formación de hueso vital: 26,77%±9,63% (G) Vs 18,77%±4,74% (P); Injerto residual: 20,01%±8,97% (G) Vs 21,66%±10,47% (P).
Klüppel y cols. 2013(203)	Animal (conejo)	18	Xenoinjerto y control (autogeno)	Defectos en Calota.	Grande: 750-1000 µm Vs. Mediana: 450-749 µm Vs. Pequeña: <450 µm.	Partículas más pequeñas mejor propiedad osteoconductiva. Partículas más grandes mayor formación de TC fibroso.
Kon y cols. 2014 (204)	Animal (conejo)	12	Autógeno (tibia)	Defectos en Calota.	Grande: (1.0 a 2.0 mm) Vs Pequeña: (150 a 400 µm) Vs Mezcla 50:50.	A las 8 semanas el volumen óseo en P tiende a disminuir, en G el volumen se mantiene.
Dos Anjos y cols. 2016 (205)	Humano	10	Xenoinjerto (Bio-Oss)	Elevación de seno.	Grande: (1.0 a 2.0 mm) Vs Pequeña: (0.25 a 1 mm).	No diferencias entre ambos grupos en torque de inserción ni en ISQ en el momento de la colocación de los implantes, ni a los 6 meses.
Kheur y cols. 2018 (206)	Humano	23	Aloinjerto	Expansión de cresta.	Grande: (1.0 a 2.0 mm) Vs Pequeña: (0.25 a 1 mm).	Ganancia ósea en anchura 3,82±0,19 mm (G) Vs. 2,57±0,16 mm (P).
de Molon y cols. 2019 (207)	Humano	10	Xenoinjerto (Bio-Oss)	Elevación de seno.	Grande: (1.0 a 2.0 mm) Vs Pequeña: (0.25 a 1 mm).	Sin diferencias significativas en el porcentaje de biomaterial residual, en la neoformación ósea, tejido conectivo o en la expresión de OCN, VEGF o TRAP.

Tabla 6: Resultados de una revisión propia de la literatura acerca del tamaño de partícula más efectivo para lograr regeneración ósea. Ecuación de búsqueda: (bone regeneration OR Bone augmentation OR Bone graft OR GBR) AND (Particle Size) junto con una búsqueda manual a partir de otros artículos. Se incluyen artículos en Inglés y Castellano y publicados en los últimos 15 años. Se excluyen: artículos con un tamaño muestral  $n < 10$ , estudios in vitro, estudios que no regeneraron defectos óseos y aquellos en los que emplearon materiales aloplásticos, combinados o con factores de crecimiento. Se seleccionaron 13 estudios los cuales trataron en su mayoría defectos en calota o de elevación de seno. 4 artículos observan beneficios del uso de injertos de partícula pequeña (verde), 4 artículos no observan diferencias entre el empleo de partículas grandes y pequeñas (amarillo), 1 artículo observa beneficios del empleo de un rango de tamaño medio de partícula (morado) y 4 artículos observan beneficios del uso de injertos con mayor tamaño de partícula (rojo). Por lo tanto no se consigue obtener recomendaciones clínicas claras sobre el uso de uno u otro tamaño de partícula en los diferentes defectos. Int: intervención; P: pequeña; G: Grande; ISQ: Cociente de estabilidad implantaria.

En lo que respecta a las características de superficie de los materiales de sustitución ósea, éstas vienen determinadas por su composición química, su microporosidad, la rugosidad de superficie, la unidad cristalina y el tamaño de los cristales (178,180,208). Estas características de superficie son muy importantes para la adsorción inicial de proteínas, la adhesión de OBs (diferenciados desde células madre que llegan a través de los vasos sanguíneos), el depósito de osteoide y, en consecuencia, para la aposición directa de hueso neoformado en el material (osteoconducción) (Fig. 15) (22,145).

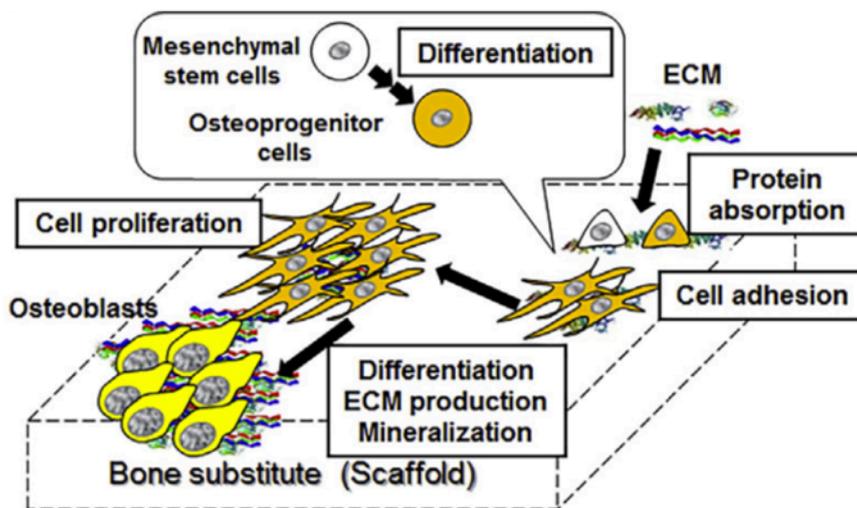


Fig. 15: Imagen de Osteoconducción del artículo "Current bone substitutes for implant dentistry" de Yamada M y Egusa H de 2018 (145).

En definitiva, para avanzar en los procesos de regeneración ósea es esencial identificar las capacidades inherentes y las limitaciones de los sustitutos óseos existentes. El conocimiento de cada uno de ellos es importante para poder aplicarlo dependiendo de la situación clínica ya que no existe un biomaterial ideal que cumpla con todos los requisitos. El clínico debe hacer un esfuerzo para seleccionar el material de injerto basándose en la evidencia científica, el tipo y el tamaño del defecto, la tasa de reabsorción del material de injerto, el coste y la aceptación por parte del paciente.

#### 1.4.4. Respuesta del huésped a los materiales de injerto

La respuesta del huésped a los injertos es un factor determinante para el éxito de la ROG. La naturaleza y el grado de respuesta del tejido óseo del huésped al material implantado parece depender de las características de los materiales: composición química, textura de la superficie, porosidad y densidad, así como de la forma y el tamaño (209).

Los materiales de sustitución ósea varían ampliamente pero el mecanismo celular básico para su integración es similar e involucra una típica secuencia de varias etapas: inicialmente el injerto óseo produce una respuesta que conduce a la acumulación de células inflamatorias, seguido de la quimiotaxis de las células mesenquimales del huésped al sitio del injerto donde se diferenciarán a OBs, finalmente se produce la formación de hueso por los OBs en la estructura tridimensional del injerto, seguido de la remodelación del mismo; simultáneamente se producen los procesos de revascularización y reabsorción del injerto óseo (Fig. 16). (142,210)

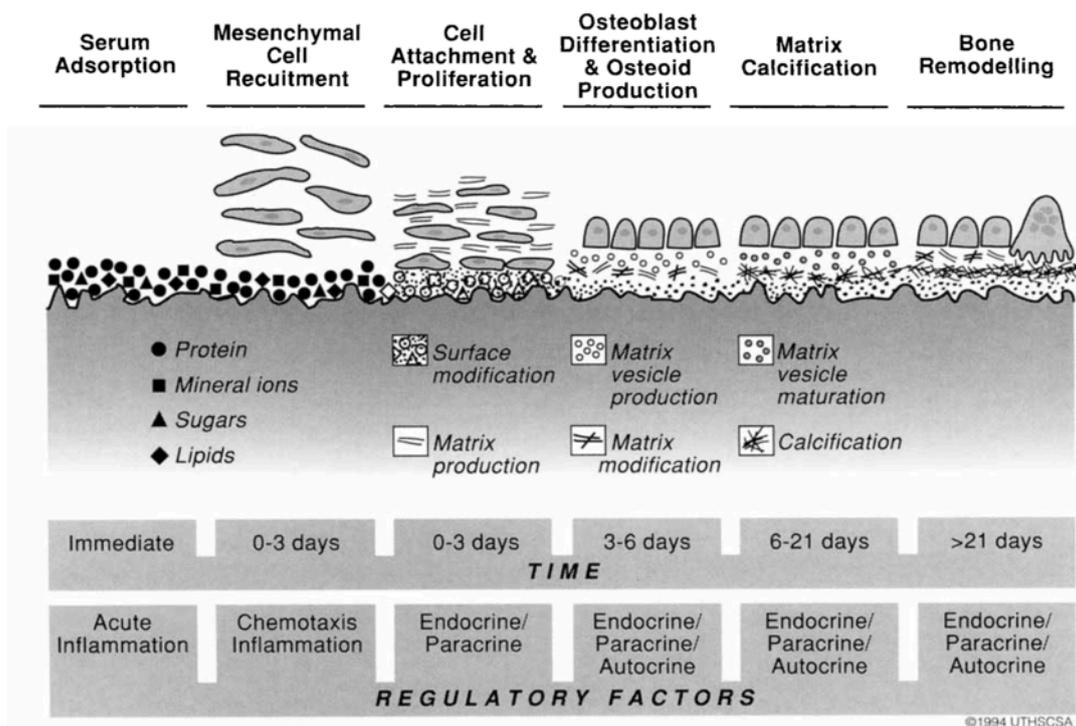


Fig. 16: Secuencia acaecida en el proceso de regeneración ósea tras la implantación de un material de injerto. Imagen del artículo "Underlying Mechanisms at the bone-biomaterial interface" de Schwartz Z y Boyan BD (210). Después de la implantación, la superficie del material es acondicionada por proteínas séricas, iones minerales, azúcares y lípidos, así como por las citocinas producidas por las células inmunes. Durante los primeros 3 días, las células mesenquimales indiferenciadas migran a la superficie del material, se adhieren y proliferan. Entre los tres y seis días de curación, las células mesenquimales experimentan diferenciación osteoblástica y se produce

*osteoide. Estas células osteogénicas responden a los agentes reguladores endocrinos, paracrinos y autocrinos. A los 6-14 días, las células comienzan a calcificar su matriz. Después de 21 días, el tejido óseo recién formado se remodela, lo que implica el reclutamiento de OCs.*

La reacción tisular inflamatoria tras la colocación de los materiales de sustitución tiene una influencia importante en los procesos de cicatrización ósea (195,211). El proceso de respuesta para todos los materiales comienza con una reacción en cascada específica del material (reacción a cuerpo extraño) (212). Esta cascada debuta con la aglomeración de proteínas en la superficie del biomaterial durante los primeros segundos a minutos desde la implantación (195). Esta capa de proteínas es específica para cada material, dependiente de sus propiedades fisicoquímicas así como de la composición química y topografía de su superficie, y media entre el biomaterial y la primera generación de células llegadas tras la implantación (Fig. 15) (195,213). Monocitos, macrófagos y neutrófilos interactúan con las proteínas, y las citoquinas específicas que se liberan guían el patrón de reacción tisular que se produce. En el transcurso de esta reacción en cascada están involucrados diversos tipos celulares con acción reguladora, como macrófagos y células gigantes multinucleadas (policariones de monocitos o macrófagos) (195). Estas células son importantes en la cicatrización de los injertos óseos y son reguladores importantes del proceso de degradación de los mismos y de la respuesta pro y anti-inflamatoria (195). Las células gigantes multinucleadas promueven la vascularización, la diferenciación de células óseas y el crecimiento óseo mediante la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (195,214).

Un estudio reciente ha mostrado que los macrófagos M1 (fenotipo pro-inflamatorio) expresan y secretan factores responsables del inicio de la angiogénesis (VEGF) mientras que los macrófagos M2 (fenotipo anti-inflamatorio) secretan factores involucrados en sus etapas tardías (PDGF) (maduración y estabilización de los vasos sanguíneos) (70,211). Se sugiere por tanto, que los injertos óseos que promuevan la polarización secuencial de los macrófagos empezando por M1 seguido de M2 conseguirán una mejor vascularización y cicatrización.

La respuesta inmune está, por tanto, fuertemente conectada con los procesos de cicatrización ósea. La respuesta a cuerpo extraño que es necesaria para la degradación completa del biomaterial vía fagocitosis, también podría causar una reacción fibrótica (encapsulación) del sustituto óseo; lo cual dependerá, entre otras cuestiones, del material de sustitución empleado (Fig. 17). (195)

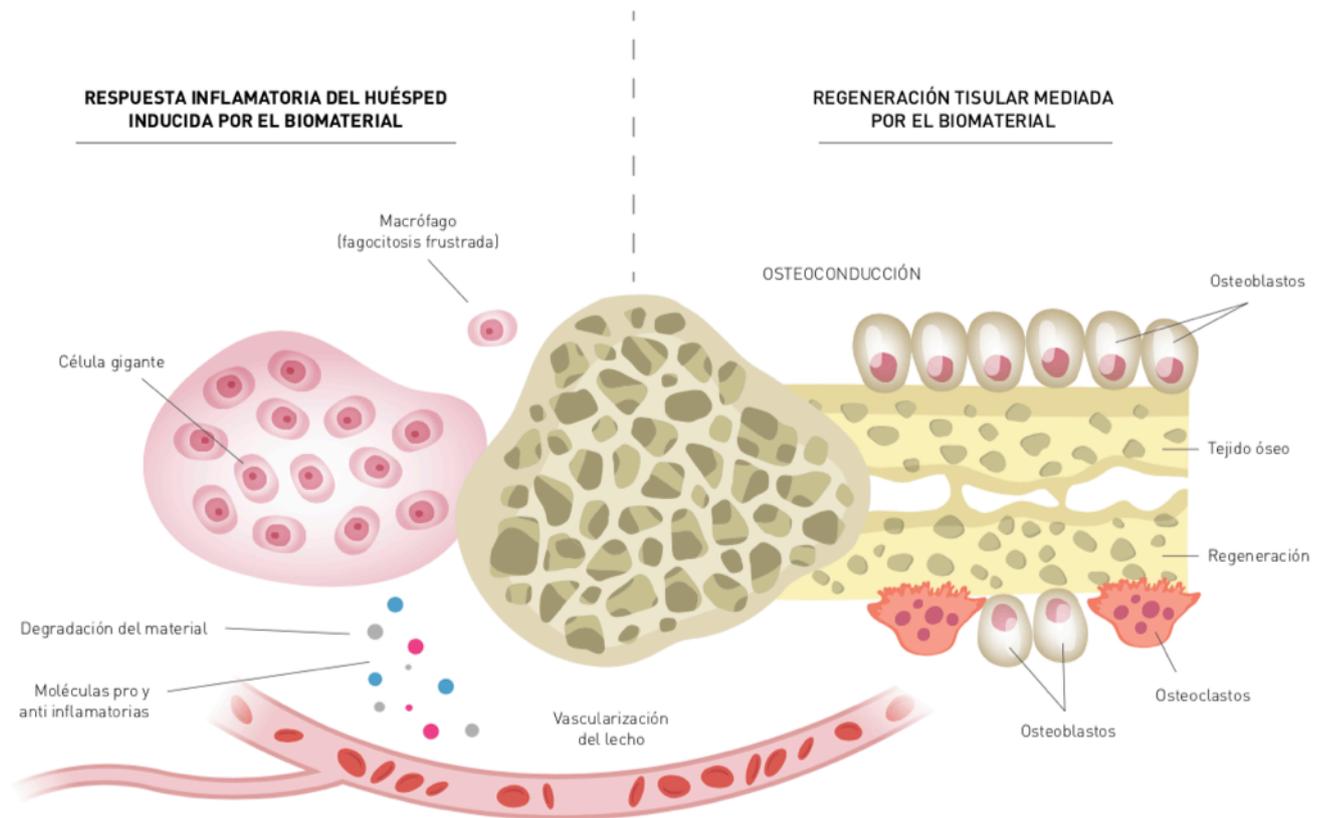


Fig. 17: Vías teóricas de inflamación inducida por el biomaterial y regeneración mediada por el material. Adaptado del artículo "Cellular mechanisms responsible for success and failure of bone substitute materials" de Rolvien y cols. en 2018 (195).

## 1.5. IMPORTANCIA DE LA VASCULARIZACIÓN EN LA REGENERACIÓN ÓSEA.

Todos los tejidos biológicos requieren aporte vascular para sobrevivir (215). La angiogénesis, entendida como el proceso en el que el organismo establece nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, es un requisito previo necesario no sólo para el desarrollo del hueso, sino también para su mantenimiento y reparación (Fig. 18) (110–112,216).

Los vasos sanguíneos están formados por varios tipos de células diferentes. La capa interna de los vasos sanguíneos está compuesta de células endoteliales, que están cubiertas en su superficie externa por células perivasculares (o murales) (217).

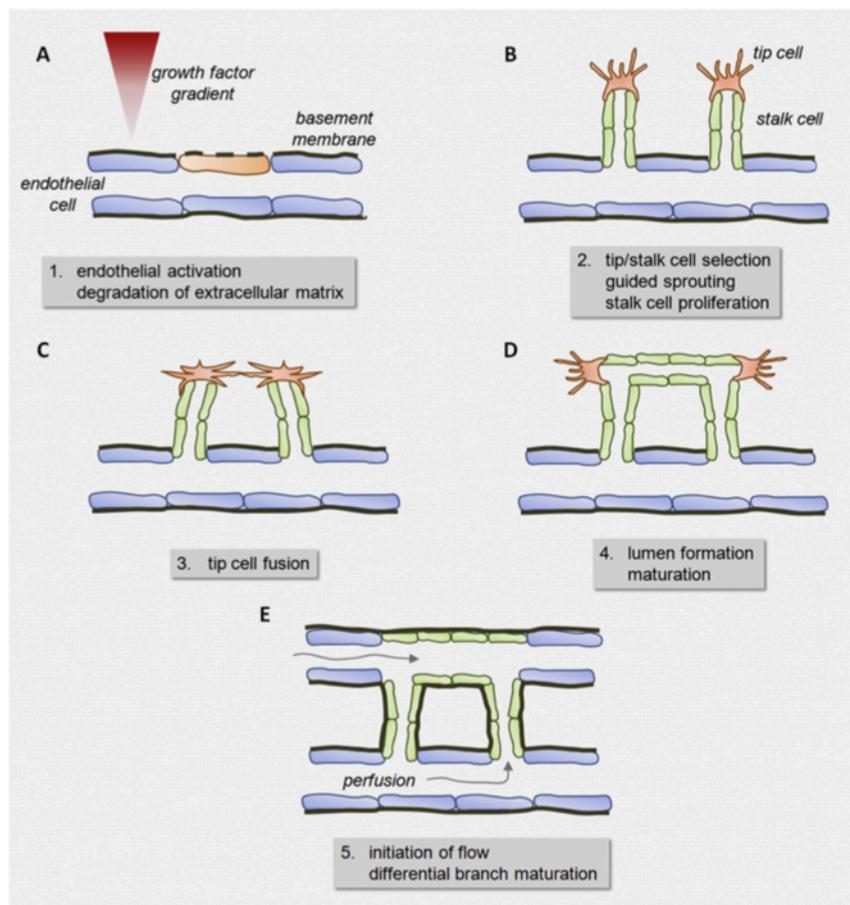


Fig. 18: Formación fisiológica de vasos sanguíneos. Imagen del artículo “Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration” de Stegen y cols. de 2015 (216). El brote de células endoteliales es el primero de una secuencia de eventos durante la angiogénesis. En un vaso en reposo, las células endoteliales y murales (pericitos) forman una membrana basal alrededor del tubo del vaso, evitando que las células endoteliales residentes migren. Cuando se necesitan nuevos vasos sanguíneos en un tejido en crecimiento, se mejora la producción local de factores de crecimiento angiogénicos, lo que provoca que la célula endotelial

*degrade la matriz extracelular de la membrana basal, un proceso mediado por metaloproteinasas de la matriz (MMP). (A) La acción de estas MMP fortalece aún más la respuesta angiogénica al liberar factores proangiogénicos que se almacenaron dentro de la matriz. Atraídas por las señales angiogénicas, algunas células endoteliales se vuelven móviles y expresan filopodia. Estas células endoteliales llamadas células de punta forman el frente principal del nuevo vaso en desarrollo; las células restantes se denominan células tallo. (B) El factor angiogénico clave VEGF estimula la inducción de células de punta y la formación de filopodios que detectan el entorno en busca de señales atrayentes, guiando los brotes hacia el estroma del tejido mientras que las células del tallo están equipadas para formar tubos y ramas, mediadas por su alta capacidad proliferativa y la capacidad de estabilizar el lumen recién formado. Se crean nuevos circuitos de vasos a través de la interacción de dos células de punta vecinas (anastomosis) (B-D); y el flujo inicia la maduración de la rama diferencial (E) Además de la maduración del endotelio, las ramas vasculares se remodelan para adaptar su rigidez a las necesidades locales del tejido.*

La angiogénesis no sólo suministra oxígeno y nutrientes, sino también células madre disponibles para diferenciarse en OBs y en fases posteriores los iones necesarios para la mineralización (216).

Se ha demostrado una íntima relación espacio-temporal entre la vascularización y la formación de hueso, donde la formación de capilares precede a la neoformación ósea (110,112,218–221). Los vasos sanguíneos sirven por tanto, como plantilla estructural alrededor de la cual tiene lugar el desarrollo óseo (220,222). Por esto, uno de los mayores retos en la regeneración ósea es la reparación de grandes defectos (defectos de tamaño crítico), puesto que en estos casos la angiogénesis espontánea desde la periferia del defecto es insuficiente para producir una formación de vasos adecuada.

### **1.5.1. Vascularización en la ROG**

Las técnicas de ROG dependen críticamente de la angiogénesis y de la osteogénesis. Aunque la ROG es un procedimiento muy satisfactorio, el éxito o fracaso de los procedimientos de aumento óseo dependen de la revascularización y reemplazo de los injertos óseos por hueso vital capaz de soportar carga (34,223); por lo tanto, es esencial la creación de nuevos vasos sanguíneos que provean de células progenitoras y nutrientes a la zona de la regeneración (111,112,215,224).

La angiogénesis juega un papel central conectando funcionalmente el material de injerto y los tejidos huésped de alrededor durante la osteointegración del biomaterial (223). Una red vascular madura y bien establecida puede asistir y acelerar los procesos regenerativos. Por el contrario, una vascularización insuficiente se considera la mayor limitación para la integración y funcionalidad del injerto. El diseño de los biomateriales ha sido ampliamente estudiado ya que debe permitir una adecuada migración y penetración celular. Tal y como se ha descrito en apartados previos, los sustitutos óseos deberían mostrar una microestructura porosa e interconectada que favorezca la infiltración vascular y la formación de nuevo tejido y evite restricciones en la difusión de oxígeno o nutrientes (208,222,225). La migración mejorada de células endoteliales a la matriz para desarrollar lechos vasculares será crítica para la supervivencia de estas construcciones óseas implantadas. Muchas veces se consigue una adecuada regeneración u osteointegración en la periferia de los injertos con unos resultados más limitados en el centro debido a una menor penetración vascular en esa zona (Fig. 19) (208,225). La cicatrización dependerá del ratio y rango de crecimiento vascular dentro del sustituto óseo (230).

En general la supervivencia de las células óseas depende de la proximidad a los vasos sanguíneos. Los OBs deben residir a menos de 150-200 micras del capilar para sobrevivir, a esta distancia se puede producir la difusión de oxígeno y nutrientes que soportan y mantienen la viabilidad tisular y la eliminación de los productos de deshecho (208,225).

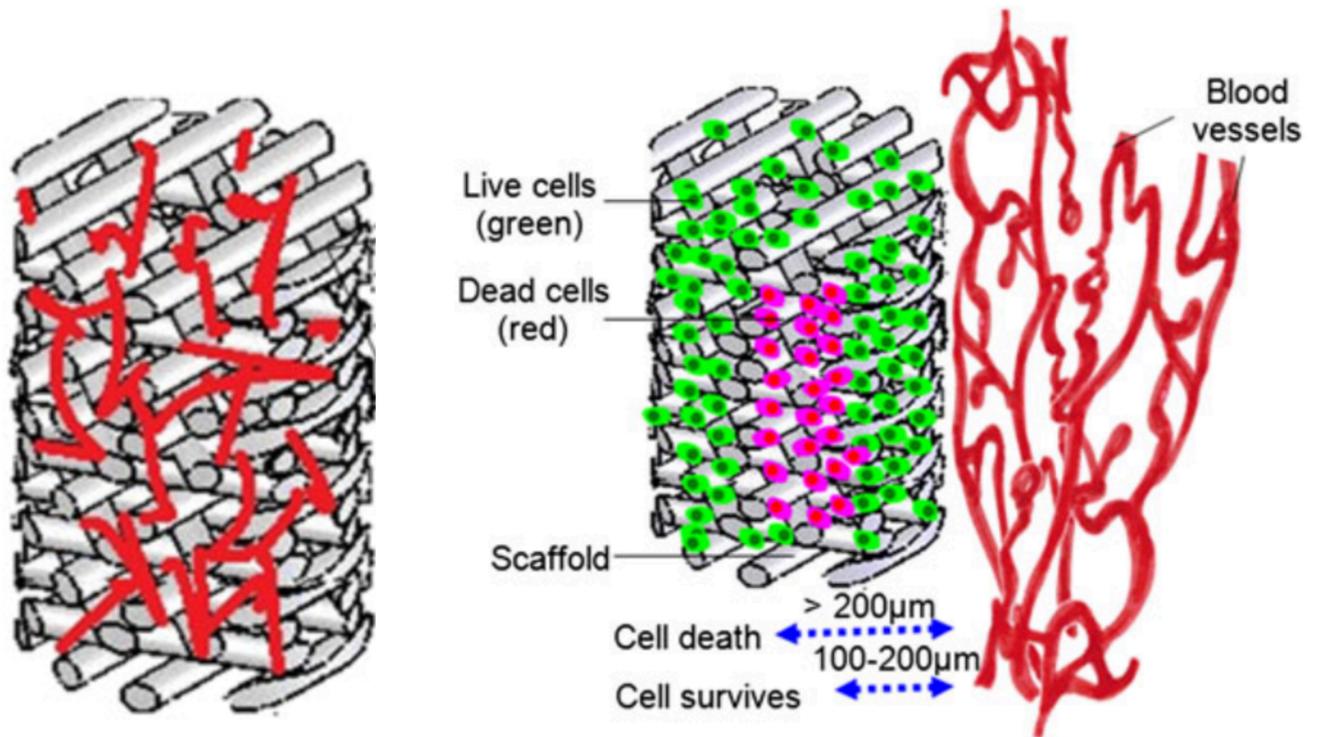


Fig. 19: Ilustración de la penetración y viabilidad celular en un sustituto óseo. Distancia crítica de  $\geq 100-200 \mu\text{m}$  desde el vaso sanguíneo. Imagen del artículo: “Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems” de Liu y cols. de 2015 (208). Se observa como dentro del andamieje (scaffold) las células de la periferia con un mejor acceso a la vascularización sobreviven (verde) pero las células que están en el interior, si el aporte vascular queda alejado, mueren (rosa).

Además de soportar la viabilidad celular, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es también crítico para estimular la osteogénesis (226,227). Las células mesenquimales (precursores de OBs en la zona receptora) son los elementos celulares responsables de la regeneración y migran hacia el sustituto óseo junto con los nuevos vasos sanguíneos formados, diferenciándose a OBs responsables de la integración del injerto (52,177). Este proceso está estrechamente regulado por una serie de factores de crecimiento angiogénicos, especialmente VEGF y PDGF (211).

VEGF es probablemente el factor más importante en la formación vascular durante la angiogénesis y juega un papel principal en el acoplamiento entre la angiogénesis y la

osteogénesis (220,228). VEGF promueve la angiogénesis al estimular la movilización, reclutamiento, proliferación y diferenciación de células endoteliales y juega un papel importante en la osteogénesis al favorecer el reclutamiento, proliferación, diferenciación y supervivencia de los OBs, al promover la expresión de factores osteogénicos como la proteína morfogenética ósea-2 (BMP-2) y la proteína morfogenética ósea-4 (BMP-4) por las células endoteliales (220,221,228,229). Sucesivamente, los OBs diferenciados secretan factores angiogénicos como PDGF y VEGF para seguir apoyando la angiogénesis (220,228). También se ha visto que si hay sobreexpresión de VEGF, se podría causar reabsorción ósea debido a un mayor reclutamiento y diferenciación de OCs (220).

Diferentes mecanismos desencadenan la angiogénesis, quizás el más conocido es la hipoxia. Durante la regeneración ósea, cuando hay exposición a hipoxia durante la inflamación (debida a la falta de aporte de oxígeno y a la intensa actividad celular), los OBs median una respuesta estimuladora de la formación de vasos sanguíneos mediante la expresión de diferentes factores incluyendo VEGF por la vía del factor de transcripción inducible por hipoxia-1 (HIF-1 $\alpha$ ) (220,228).

## 1.6. INFLUENCIA DE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA EN LOS RESULTADOS DE LA ROG.

Como ya se ha descrito anteriormente, la ROG es una técnica ampliamente utilizada en Odontología debido a que está perfectamente documentada y ha demostrado altas tasas de éxito en el tratamiento de defectos óseos maxilares, siempre y cuando se respeten dos requisitos previos: suministro abundante de sangre y soporte mecánico (15).

Los procedimientos de aumento óseo son muy sensibles a la técnica quirúrgica empleada (97), por lo que en los resultados influye la destreza del operador (230). Se deben contemplar 4 principios biológicos esenciales que se explican a continuación (23):

### - Cierre Primario

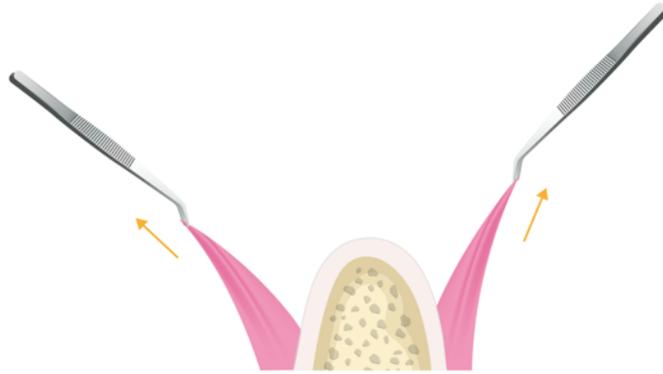
Se trata de aproximar y unir de los bordes de la herida para conseguir un cierre inmediato adecuado, creándose un ambiente favorable que permite un adecuado remodelado del tejido. Además el cierre primario previene la infección y consigue un menor dolor postoperatorio.

Diversos estudios han mostrado menor formación ósea en zonas con exposición de membrana. Machtei en 2001 (231) llevó a cabo un meta-análisis para evaluar los efectos de la exposición de la membrana en los resultados de la ROG, donde observó 3,01 mm de ganancia ósea en zonas sumergidas comparado con 0,56 mm de nuevo hueso cuando hubo exposición de la membrana. Simion y cols. en 1994 (232) observaron un 99,6% de regeneración ósea en procedimientos de ROG peri-implante con membranas sumergidas versus 48,6% en zonas con exposición. Una revisión sistemática de la literatura ha concluido que tras la exposición de la membrana en crestas edéntulas se consigue un 74% menos de ganancia ósea horizontal, y en dehiscencias peri-implante un 27% menos de reducción del defecto (137).

Un diseño correcto del colgajo, una aproximación sin tensión del colgajo, una técnica de sutura adecuada y un cuidado postoperatorio adecuado de la herida son claves para conseguir y mantener un adecuado cierre primario (Fig. 20) (23).

En aquellas ocasiones en las que la disponibilidad de tejidos blandos es limitada y nos podría impedir la ganancia de volúmenes importantes de hueso debido a la

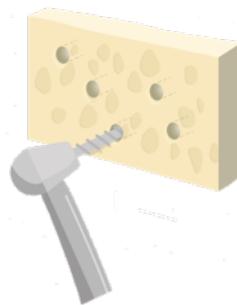
incapacidad de conseguir un correcto cierre primario, es recomendable aumentar el volumen de tejidos blandos previo a la regeneración ósea (97).



*Fig. 20: Representación de la liberación del colgajo para su correcta distensión para lograr un adecuado cierre primario.*

#### - **Angiogenesis**

Como ya se ha explicado anteriormente la vascularización de la zona es esencial en el proceso regenerativo. Para promoverla y mejorarla se ha propuesto la decorticalización de los defectos (penetrando en la medular) para conseguir una mejor migración de células con potencial angiogénico y osteogénico (Fig. 21).



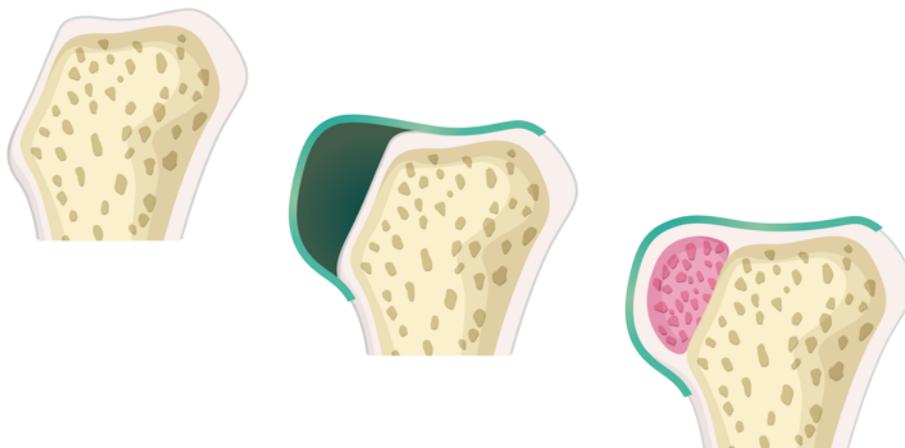
*Fig. 21: Representación de la decorticalización ósea o penetración medular.*

Aunque no hay un consenso sobre los beneficios de la decorticalización (23,111), parece que abrir la cavidad medular mejora la angiogénesis al abrir los espacios medulares ricos en vasos sanguíneos y reservorio de células osteoprogenitoras; además,

se provoca un aumento local de factores de crecimiento desde la superficie lesionada, se facilita la interconexión física del injerto y la zona huésped y el propio trauma ocasionado al hueso cortical inicia el fenómeno de aceleración regional (RAP) (23,111).

#### - **Mantenimiento del Espacio**

Uno de los principales objetivos es el de preservar las dimensiones de la zona a regenerar. Se necesita un espacio estable donde asegurar la proliferación de células formadoras de hueso mientras se excluye a las células epiteliales y conectivas (23). El colapso de la membrana (por presión de los tejidos suprayacentes) se ha asociado con una menor regeneración (23,233). Para evitar tal complicación, se ha propuesto el uso de membranas reforzadas y/o la colocación de materiales de injerto bajo la membrana (Fig. 22).



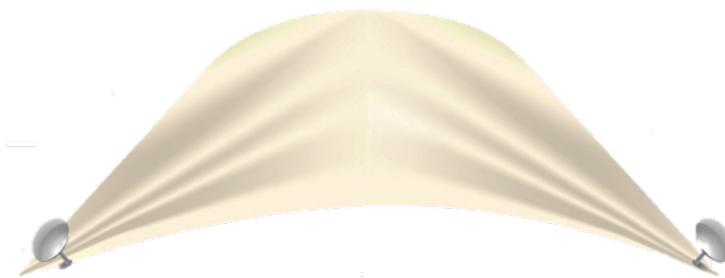
*Fig. 22: Representación de un adecuado mantenimiento del espacio mediante el uso de membranas reforzadas o la colocación de materiales de injerto.*

#### - **Estabilidad de la Herida**

El papel de la membrana es doble ya que además de excluir las células no deseadas, actúa estabilizando el coágulo (23,111). La movilidad causada por presión de prótesis removibles, hábitos del paciente, masticación, etc. interrumpe la formación del coágulo y el tejido de granulación subsecuente (234). Además el movimiento disminuye la capacidad de exclusión celular de la membrana permitiendo la entrada de fibroblastos al área (235,236). Asimismo, la inestabilidad mecánica es responsable de

micromovimientos que pueden provocar una sucesiva ruptura de los capilares neoformados, enlenteciendo o incluso imposibilitando la formación ósea (237,238). Para evitar dichos problemas, se aconseja fijar la membrana para conseguir una mayor estabilidad en el defecto (23), ya sea mediante el uso de suturas, pins corticales o tornillos (Fig. 23) (115).

En la revisión sistemática de Wessing y cols. de 2018 (115) se observó una ganancia ósea vertical menor (2,94 mm) cuando no se fijaban las membranas en comparación a procedimientos en los que fueron fijadas (4,25 mm). Además, fijar la membrana ayuda a inmovilizar el injerto óseo particulado en la posición deseada y ayuda a prevenir la migración del mismo (115).



*Fig. 23: Representación de la fijación de la membrana y estabilización de la herida mediante el uso de chinchetas o pins.*

Por otro lado existen otra serie de aspectos de la técnica quirúrgica, que pueden afectar al resultado de la ROG, pero han sido menos estudiados. Entre ellos destaca la influencia de las diferentes fuerzas de compresión durante la colocación de los injertos óseos particulados, en los resultados de angiogénesis y neoformación ósea de las zonas injertadas. Las recomendaciones clínicas a este respecto son contradictorias, y carecen de una adecuada base científica. Y no sólo respecto a la fuerza aplicada, sino los propios instrumentos empleados para realizar la compactación carecen de recomendaciones precisas (Fig. 24) (29,31) y en ningún caso aportan información sobre la fuerza que se está realizando durante la manipulación del biomaterial contra el lecho receptor.



*Fig. 24: Diversos instrumentos que se pueden utilizar para la colocación de los materiales de injerto óseo particulado durante los procedimientos de regeneración ósea guiada en los maxilares.*

Ciertos autores sostienen que una sobrecompactación podría reducir los espacios huecos que debe proveer el material para la penetración vascular y celular pudiendo afectar por esa vía a la formación de hueso y, en consecuencia, a la consolidación del injerto (22,29–31); sin embargo, también podría conseguir una mayor área de biomaterial para la aposición celular y reducir los micromovimientos de los injertos particulados (32,33) que podrían interrumpir la formación ósea induciendo formación de tejido blando (146).

Actualmente, en la literatura, hay pocos estudios que abarquen este tema. Los únicos estudios, hasta la fecha, que evalúan el papel de la presión de compactación sobre el injerto óseo

particulado son: el de Romanos y cols. de 2018 (34), el de Delgado-Ruiz y cols. de 2018 (239), y el de Cho y cols. de 2017 (240); habiéndose mostrado en ellos una relación entre una mayor fuerza de compresión y unos mejores resultados en cuanto a la regeneración ósea.

Estos estudios cuentan con una metodología controvertida, poco reproducible y difícilmente trasladable o extrapolable a la clínica, como por ejemplo cuando realizan la compresión con monedas envueltas en papel de aluminio, con pesas o con un dinamómetro digital de uso industrial sin adecuada manejabilidad clínicas. A la fecha de inicio del presente trabajo no existía un instrumento capaz de realizar la compactación durante los procedimientos de regeneración ósea en el área de cirugía oral, que controle la cantidad de fuerza o presión que se realiza.

A nuestro entender, existe una necesidad importante de ampliar la investigación en este campo, ideando, diseñando y desarrollando un instrumento de compactación con manejabilidad en clínica, capaz de compactar el biomaterial midiendo o controlando la presión que se ejerce sobre él y especialmente de establecer una correlación entre esa presión controlada y los resultados de la regeneración. De estas necesidades surge la motivación de esta tesis.





## **2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS**



Del análisis y valoración crítica del estado actual del tema, surge la siguiente hipótesis de trabajo:

“La fuerza de compresión, durante la colocación de los injertos óseos particulados en el lecho óseo receptor mediante una técnica de regeneración ósea guiada, influye en la regeneración de un defecto óseo en lo que respecta a la angiogénesis y a la neoformación ósea”

Formulada la Hipótesis de trabajo como una afirmación o pregunta dirigida a todo el marco del estudio, es indudable que dada su generalidad surgirán más interrogantes, más construcciones teóricas que nos obligarán a generar sucesivas hipótesis. Por ello, con una visión pragmática, reduccionista y explicativa, preferimos hablar de objetivos, en vez de hipótesis, sin que por ello nos olvidemos de lo que significan y representan.

Objetivos generales:

1. Mostrar que diferentes fuerzas de compresión durante el empaquetamiento del injerto óseo particulado se relacionan con diferentes porcentajes de tejido óseo mineralizado neoformado.
2. Determinar la relación directa entre la fuerza de compresión durante el empaquetamiento del injerto óseo particulado y el porcentaje de contacto entre el nuevo hueso y las partículas del biomaterial (Contacto hueso-biomaterial, BBC).
3. Evaluar las diferencias en el número de vasos sanguíneos y su área, en procedimientos en los que se aplican fuerzas de compresión diferentes durante el empaquetamiento del injerto óseo particulado.

Objetivos específicos:

1. Establecer el rango de fuerza aplicado en clínica durante la compactación del material de injerto particulado, en los procedimientos de regeneración ósea guiada (ROG) de los maxilares.
2. Diseñar, fabricar y calibrar un instrumento que permita controlar de manera precisa la presión de compactación de un injerto particulado, con unas características adecuadas para ser empleado en clínica.
3. Comprobar, haciendo uso del instrumento anterior, la influencia de la presión ejercida con respecto a los espacios resultantes entre las partículas del injerto provistos para la migración y proliferación de los nuevos vasos sanguíneos y células.
4. Comparar el porcentaje de hueso neoformado, durante un procedimiento de ROG, cuando se aplican dos fuerzas de compresión sobre el material de injerto, una de mayor magnitud que la otra.
5. Identificar las diferencias en el porcentaje de contacto entre el nuevo hueso y las partículas del biomaterial (BBC), cuando se compacta el material de injerto con dos fuerzas de compresión diferentes en magnitud, durante un procedimiento de ROG.
6. Establecer si una fuerza de compactación del injerto mayor que otra, produce diferencias en la cantidad de vasos sanguíneos y su área, durante el proceso de angiogénesis que acontece durante una ROG.





## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



Con la intención de poder responder a los objetivos generales y específicos marcados, resultó necesario plantearse en primer lugar los siguientes diseños y estudios pilotos previos:

- Estudio para determinar el rango clínico de presión de compactación del material de injerto: fundamental para poder establecer presiones sujetas a comparación en el estudio definitivo y que correspondan con fuerzas aplicadas clínicamente.
- Diseño y fabricación de un instrumento para la compactación del biomaterial capaz de controlar la presión ejercida: necesario para poder acometer el diseño experimental de una manera predecible, repetible y reproducible y sin sesgos respecto a la presión aplicada.
- Desarrollo de un contenedor quirúrgico cilíndrico que acote el defecto óseo: preciso para contener el material de injerto dentro del defecto creado, de forma que el resultado de la manipulación y compactación de material sea homogéneo para todos los defectos.
- Determinación in vitro del efecto de compresión del material mediante técnicas de Microscopía y Micro-tomografía Computerizada (micro-CT): con el objetivo de comprobar que las presiones elegidas, con el instrumental desarrollado, generaban diferentes disposiciones del material de injerto comprimido.
- Estudio piloto sobre un animal de experimentación: con el objetivo de detectar problemas o fallos de la metodología y verificar la posibilidad de registrar las variables a estudio.

Finalmente se realizó el estudio principal de la investigación sobre animales de experimentación para responder a los objetivos generales previamente fijados.

### **3.1. ESTUDIO PARA LA DETERMINACIÓN DEL RANGO CLÍNICO DE PRESIÓN DE COMPACTACIÓN DEL MATERIAL DE INJERTO.**

En la literatura científica se encuentran trabajos con objetivos similares al nuestro, que de la misma manera intentan evaluar la influencia de la compresión del material de injerto en el proceso de regeneración (34,239,240). Lo que llama la atención es la disparidad de las fuerzas ejercidas (desde 4,1 g hasta 3059 gf) sin que en ningún momento se haga una justificación de la elección de esos límites o si tiene relación con las presiones normalmente aplicadas en la práctica clínica.

Por ese motivo, en primer lugar se consideró necesario establecer el rango de compresión del material de injerto particulado en clínica. Para tal fin se realizó un estudio involucrando a 8 cirujanos orales experimentados en técnicas de ROG y a los que se les pidió que hiciesen compactaciones sobre un biomaterial contenido en un recipiente, sobre una báscula de precisión (Precisión: 0,01 g; Steinberg Systems SBS-LW-2000A, Polonia) simulando la compactación realizada intra-quirúrgicamente. Cada uno de los cirujanos repitió la compactación 50 veces y se anotó para cada ocasión el peso en gramos indicado por la báscula.

Se recogieron los datos y se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo con el programa estadístico SPSS Statistics 22.0 para Windows. Se compararon las medias y desviaciones estándar de las mediciones de presión ejercidas por cada uno de los cirujanos.

### 3.2. DISEÑO Y FABRICACIÓN DE UN INSTRUMENTO PARA LA COMPACTACIÓN DEL BIOMATERIAL.

A pesar de que la regeneración ósea mediante el uso de injertos óseos particulados es un procedimiento frecuentemente utilizado en cirugía oral, no hay disponible una herramienta compactadora capaz de medir la fuerza que se está ejerciendo durante la colocación de estos materiales. La condensación del biomaterial por tanto se realiza con diferentes compactadores manuales, sujetos a la preferencia del clínico, sin reparar en la fuerza que se esta ejerciendo por lo que la presión resultante que se ejerce sobre el biomaterial es totalmente subjetiva.

Para evitar que esta limitación se trasladara a la metodología de nuestro estudio definitivo, tuvo que ser diseñado un instrumento de compactación que cumpliera los siguientes requisitos:

- Aplicar presión en un rango correspondiente a la presión ejercida clínicamente durante la compactación de injerto, previamente establecida en el estudio anterior.
- Estar calibrado y tener una precisión adecuada.
- Ser de sencillo manejo y de aplicación manual, aplicable tanto en investigación como en clínica.

Cumplir estos requisitos nos permitiría:

- Evaluar en estudios de investigación aplicada (animales de experimentación) si la fuerza de compresión en el empaquetamiento del injerto óseo influye sobre la angiogénesis y la regeneración ósea, ver de qué manera influye, y observar qué condición de compactación es preferible.
- Estandarizar los futuros estudios de investigación que se realicen en relación con éstos biomateriales, eliminando un posible factor de confusión como podría ser la fuerza de compactación.
- Obtener mejores resultados en los procedimientos de regeneración ósea al realizar la compactación en el rango de fuerzas que se haya visto sea más deseable, en el caso en que se describiese algún rango de fuerzas de compresión con el cual se obtuviesen mejores resultados.

El diseño inicial se basó en un dinamómetro de compresión. El dinamómetro es una herramienta que a partir de los cambios en la elasticidad de un muelle, con una determinada calibración, permite calcular el peso de un cuerpo o realizar la medición de una fuerza.

El dinamómetro tradicional basa su funcionamiento en el estiramiento de un resorte que sigue la ley de elasticidad de Hooke siendo las deformaciones proporcionales a la fuerza aplicada:

Donde:

$$\vec{F} = k \cdot \vec{x}$$

$\vec{F}$  es la fuerza que se aplica al muelle.

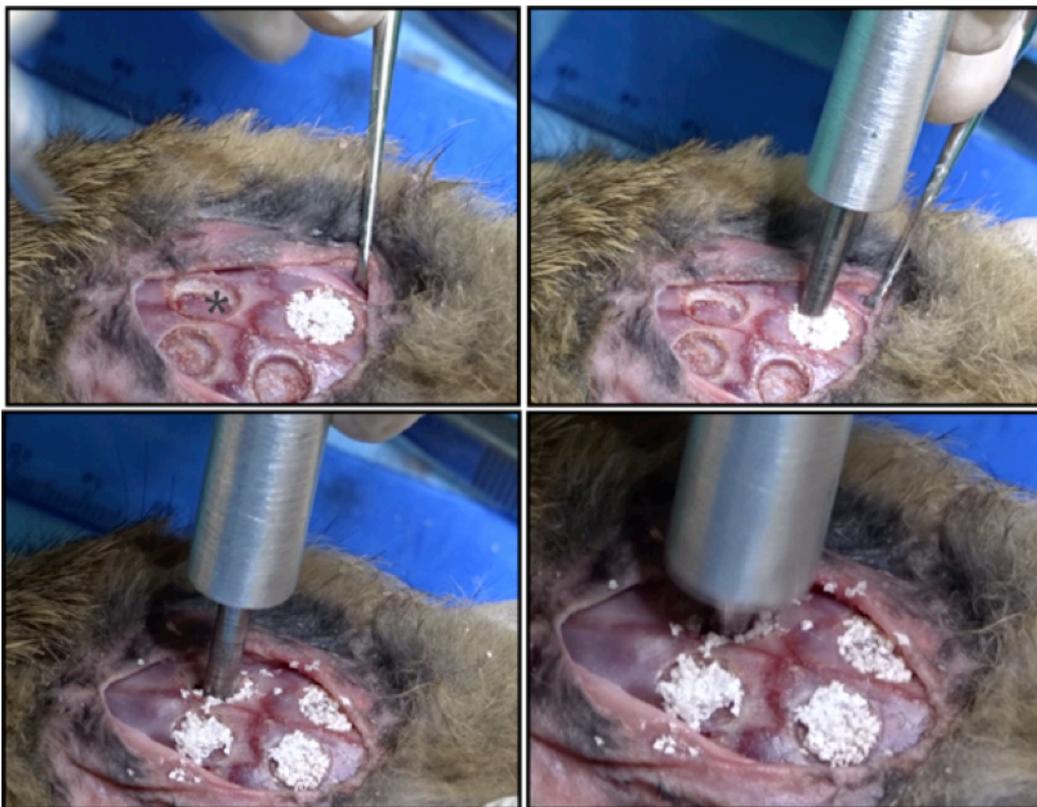
$k$  es la constante de elasticidad del muelle.

$\vec{x}$  es un vector que indica la variación de longitud que experimenta el muelle.

Tras la realización de los planos del instrumento con el software informático AutoCAD 2014, se solicitó su fabricación por un Oficial de Primera de un taller de mecanizado en un torno convencional (Pinacho SC200; Huesca, España). Se pidió que se mecanizase en acero inoxidable para poder ser esterilizable y con un tamaño similar al de un bolígrafo o compactador manual para permitir su uso durante la compactación intraoral.

### 3.3. DESARROLLO DE UN CONTENEDOR QUIRÚRGICO CILÍNDRICO QUE ACOTE EL DEFECTO ÓSEO.

Las primeras pruebas o ensayos para probar la técnica quirúrgica a aplicar en el estudio definitivo, se realizaron sobre la calota de un conejo de carnicería para consumo humano (Fig. 25). Durante estas pruebas se comprobó que la superficie de la calota no es especialmente gruesa ( $\approx 2,0$  mm). Por este motivo, a la hora de perforarla a espesor total se ponía en peligro la integridad de la duramadre y además no era posible probar determinadas fuerzas de compresión debido a la laxitud de la misma. Si por el contrario, se mantenía una finísima capa de cortical interna apenas quedaba grosor para las partículas de xenoinjerto aun siendo éstas de pequeño tamaño (0,5-1,0 mm).



*Fig. 25: Pruebas de la técnica: El defecto marcado con el asterisco (\*) es el único defecto que llega a duramadre, el resto conservan una finísima capa de cortical. En los defectos que preservan algo de cortical interna apenas entra el grosor de la partícula a pesar de tratarse de partículas de pequeño tamaño.*

Por tanto, se solicitó a la empresa Soadco S.L. (Escaldes-Engordany, Andorra) la fabricación de unos cilindros de titanio basándonos para su diseño en estudios previos (241–246) que nos permitiesen generar defectos de un adecuado tamaño y grosor manteniendo intacta la cortical interna. De esta manera, se pretendía evitar daños en la duramadre generando por tanto una menor morbilidad y además contar con un aumento de la superficie de contacto hueso-biomaterial (247).

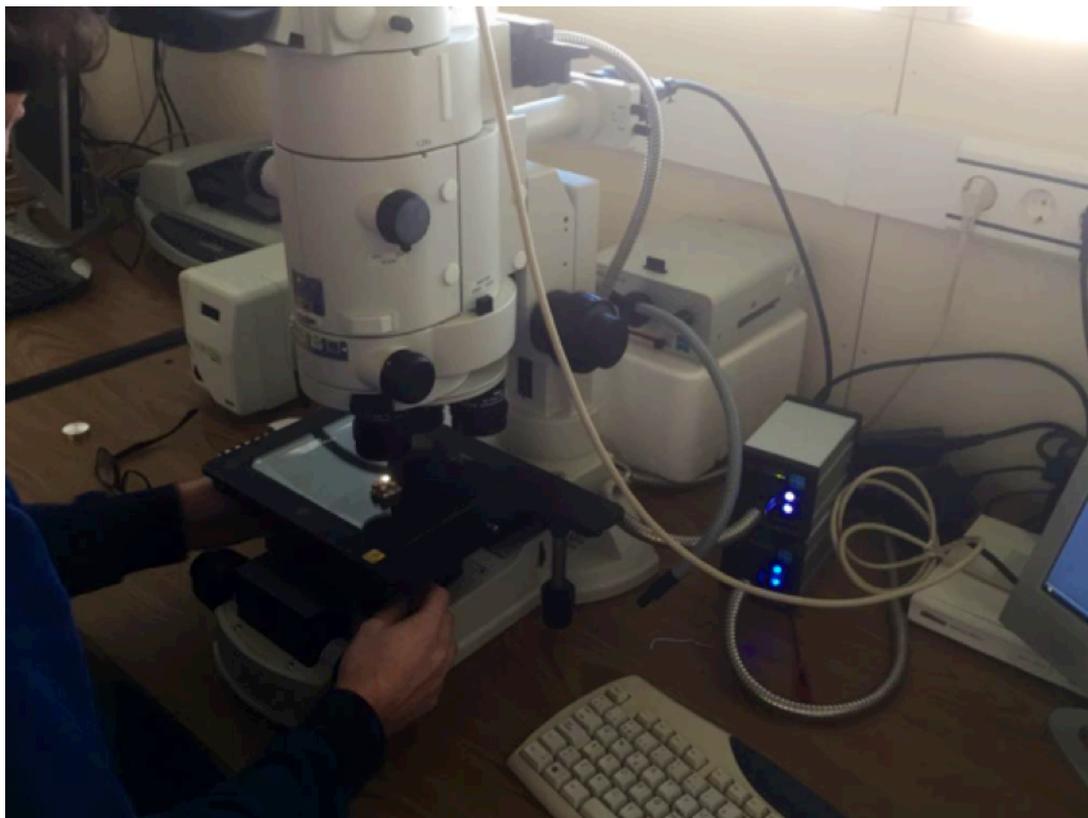
### **3.4. DETERMINACIÓN IN VITRO DEL EFECTO DE LA COMPRESIÓN DEL MATERIAL MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA Y MICRO-TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA (MICRO-CT).**

Dado que el objetivo principal del estudio es evaluar si diversas fuerzas de compresión del xenoinjerto particulado pueden influir en el proceso de regeneración ósea, se realizaron inicialmente varias pruebas in vitro. Con la intención de observar la reorganización de las partículas al realizar diferentes fuerzas de compresión, comprobar si hay disminución de espacios libres o de la distancia entre las partículas por donde se prevé penetrarán vasos y células durante la regeneración ósea se realizaron los siguientes experimentos:

#### **3.4.1. Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microscopía óptica**

En el primer experimento se observaron con microscopía de luz (Nikon AZ100; Brighton, USA), (Fig. 26) las muestras de hidroxapatita de origen bovino particulado (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm) ubicadas en recipientes de plástico y sometidas a diferentes fuerzas de compresión.

- Sin compresión.
- Tras realizar tres compresiones de 82 gf.
- Tras realizar tres compresiones de 132 gf.
- Tras realizar tres compresiones de 186 gf.



*Fig. 26: Microscopio óptico Nikon AZ100 (Brighton, USA) de la UPV-EHU: Con la colaboración del Dr. Fernando Unda Rodríguez del Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco y del Dr. Ricardo Andrade del Servicio General de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina de la Universidad del País Vasco.*

### **3.4.2. Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Posteriormente se decidió realizar una observación de estos resultados con mayor detalle, haciendo varias pruebas con microscopía electrónica de barrido (SEM).

Tras colocar las muestras de hidroxapatita de origen bovino particulado (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm) en unos dispositivos de cobre que preparamos específicamente para este objetivo (Fig. 27), se observaron con el microscopio electrónico de barrido (Hitachi S3400; Tokyo, Japón) (Fig. 28).

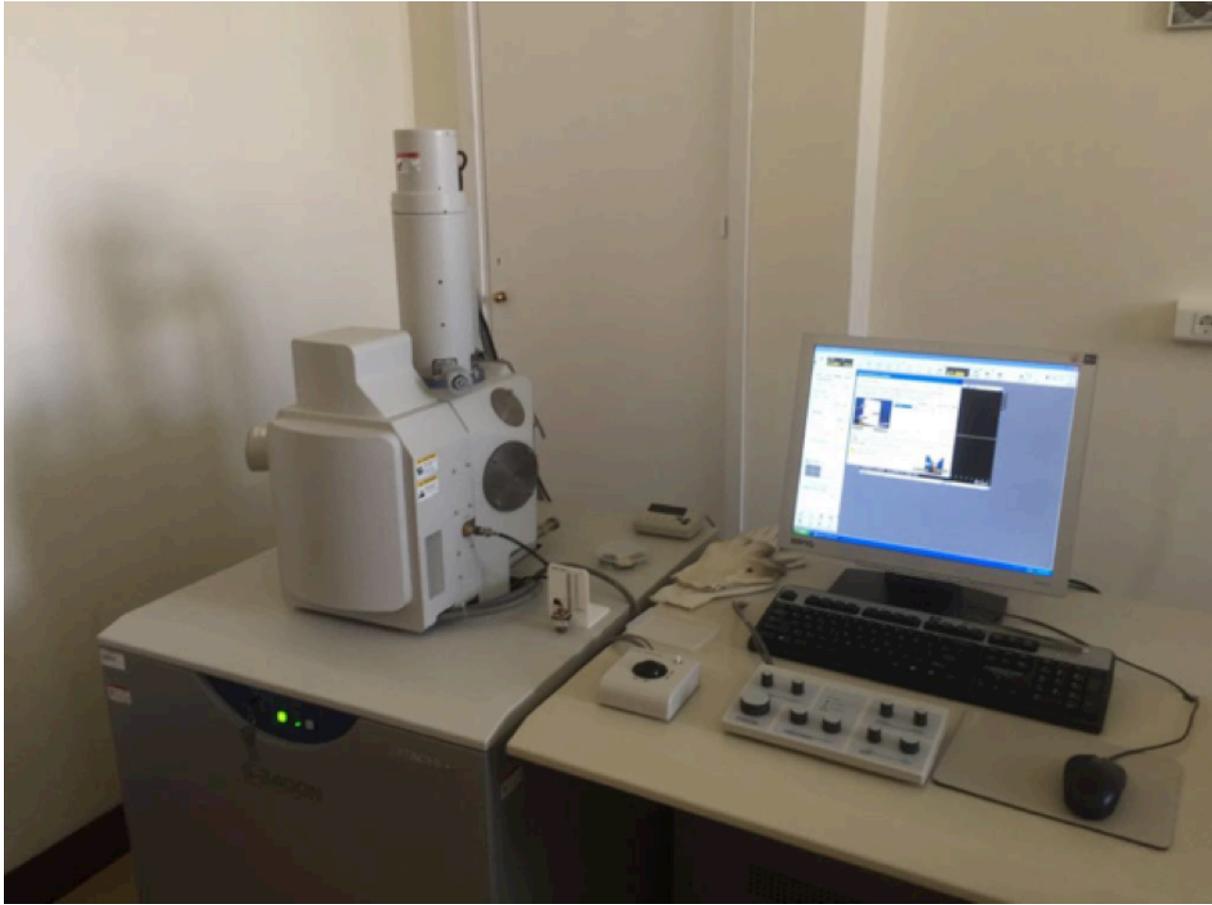
En el microscopio se uso un modo de presión variable a 120 Pascales (Pa), con un voltaje de 25.0 kilovoltios (kV) y un detector de electrones secundarios específico para presión variable (ESED).

Se observaron las muestras:

- Sin compresión.
- Tras realizar tres compresiones de 82 gf.
- Tras realizar tres compresiones de 132 gf.
- Tras realizar tres compresiones de 186 gf.
- Tras realizar tres compresiones de 342 gf. Fuerza conseguida tras añadir tres topes al instrumento, esta fuerza también a sido calibrada (ver Anexo).



*Fig. 27: Dispositivo de cobre diseñado para la visualización de diferentes muestras de hidroxiapatita bovina con microscopio electrónico de barrido (SEM).*



*Fig. 28: Microscopio electrónico de barrido Hitachi S3400 (Tokyo, Japón) de la UPV-EHU: Con la colaboración del Dr. Fernando Unda Rodríguez del Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco y del Dr. Ricardo Andrade del Servicio General de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina de la Universidad del País Vasco.*

### **3.4.3. Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microtomografía computerizada de alta resolución (micro-CT)**

Con el objetivo de cuantificar las diferencias en el porcentaje de poro, el volumen de poro, el porcentaje de la muestra que ocupan las partículas,... entre las muestras comprimidas con diferentes fuerzas, se empleó microtomografía computerizada de alta resolución (micro-CT).

Se puso en marcha un estudio donde se hicieron compactaciones, con el instrumento previamente descrito, sobre  $0,20 \pm 0,01$  gramos de xenoinjerto particulado de origen bovino (Cerabone<sup>®</sup> de Botiss Biomaterials GmbH, Dieburg, Alemania) a diferentes fuerzas en unos viales de ensayo y se observó su reorganización mediante micro-CT.

El pesaje del material se realizó mediante una báscula de precisión SBS-LW-2000A-2000g (Steinberg Systems, Zielona Góra, Polonia) con una precisión de 0,01 g (Fig. 29).



*Fig. 29: Preparación de las muestras para su observación mediante micro-CT.*

Para cuantificar la microestructura 3D, las muestras se escanearon realizando una microtomografía computarizada de alta resolución (SkyScan 1174 de Bruker, Kontich, Bélgica) (Fig. 30). Las imágenes se obtuvieron mediante rayos X a un voltaje de 50kV y a un amperaje de 800 $\mu$ A.



*Fig. 30: Microtomografía computerizada de alta resolución SkyScan 1174 (Bruker; Kontich, Bélgica). Con la colaboración de Vanessa Loredó López y Eva Pascual de la Calle de la Unidad de Imagen Preclínica del Bioterio de la Universidad de Oviedo.*

Todas las muestras se escanearon utilizando un filtro de aluminio de 1 mm y con una resolución de 11,8 píxeles. Para cada muestra, se obtuvieron una serie de 613 imágenes con un paso de rotación de  $0.3^\circ$  y un promedio de 2 fotogramas para una rotación total de  $180^\circ$ . El tiempo de escaneo para cada muestra fue de aproximadamente 3 horas usando un tiempo de exposición de 8500 ms. La corrección de campo plano se realizó al comienzo de cada exploración. Las imágenes obtenidas durante el escaneo se reconstruyeron utilizando el software NRecon (Control Software, SkyScan 1174 de Bruker, Kontich, Bélgica). Los valores de corrección del coeficiente de atenuación, endurecimiento del haz, suavizado y reducción de artefactos de anillo fueron los mismos en todas las muestras. Para el análisis de porosidad se utilizó el software CTAn (Software for measurements and visualization, SkyScan 1174 de Bruker, Kontich, Bélgica). El volumen de interés (VOI) se delimitó manualmente en cada una de las muestras. Los niveles de umbral de escala de grises globales para estas áreas estaban entre 68 y 255.

Se realizaron 2 análisis:

#### 3.4.3.1. Primer análisis

En el primer estudio se analizaron diferentes muestras tras comprimir las partículas con diferentes fuerzas de compresión. Incluso se analizaron posibles diferencias en función del número de compresiones. Los experimentos se realizaron tanto con muestras de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm), como de tamaño de partícula grande (1,0-2,0 mm) a las fuerzas y número de compresiones que se indican a continuación:

- Sin compresión.
- Tras realizar tres compresiones de 82 gf.
- Tras realizar tres compresiones de 132 gf.
- Tras realizar tres compresiones de 186 gf.
- Tras realizar tres compresiones de 299 gf. Fuerza conseguida tras añadir dos topes al instrumento, esta fuerza también a sido calibrada, ver Anexo.
- Tras realizar tres compresiones a 342 gf. Fuerza conseguida tras añadir tres topes al instrumento, esta fuerza también a sido calibrada, ver Anexo.
- Tras realizar diez compresiones a 342 gf.

#### 3.4.3.2. Segundo análisis

Se realizó un segundo análisis donde se analizaron las mismas muestras antes y después de la compresión. En esta ocasión se evaluó tan sólo el material (Cerabone<sup>®</sup> de tamaño de partícula pequeña, 0,5-1,0 mm) y las fuerzas que se emplearían posteriormente en la experimentación in vivo.

- Se analizó una muestra del biomaterial y después, esa misma muestra se volvió a analizar tras haber sido sometida a tres compresiones de 82 gf.
- Otra muestra de Cerabone<sup>®</sup> de tamaño de partícula pequeña se analizó antes y después de ser comprimida mediante tres compresiones a 186 gf.

### 3.5. ESTUDIO PILOTO SOBRE UN ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

Para cumplir los objetivos perseguidos por este estudio y poder observar el efecto in vivo de la diferente reorganización de las partículas de xenoinjerto con las distintas fuerzas de compresión durante la ROG, se propone un estudio experimental en modelo animal.

Se realizó una primera prueba en un conejo de raza Neozelandesa para comprobar la viabilidad de la técnica quirúrgica y de los métodos de análisis histomorfométricos.

Seguidamente se expone la metodología aunque se desarrollará con mayor detalle más adelante en el apartado 3.6.

Tras anestesiar al animal se rasuró y desinfectó la piel de la cabeza del animal. Se realizó una incisión a espesor total de unos 4,5 cm en la zona medial de la cabeza y tras la realización de unas osteotomías circulares estandarizadas de 0,5 mm de espesor y 8 mm de diámetro, ayudándonos de una trefina con topes, y la eliminación de la cortical externa con una fresa redonda de carburo de tungsteno (HM141F 031, Meisinger, Neuss, Alemania), se fijaron los cilindros desarrollados específicamente para este estudio (Soadco S.L., Escaldes-Engordany, Andorra).

Los defectos resultantes de 6,9 mm de diámetro y 4 mm de altura se rellenaron con hidroxiapatita de origen bovino particulado (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm).

A continuación, se comprimió el biomaterial mediante 5 compresiones a 82 gramos-fuerza (gf, sistema técnico de unidades) en el defecto del parietal derecho y mediante 5 compresiones a 186 gf en el defecto de la izquierda.

Tras los procedimientos de injerto, ambos defectos se cubrieron con una membrana reabsorbible de pericardio porcino de 30 x 40 mm (Jason<sup>®</sup> membrane, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) y se suturó la herida por capas. El animal recibió todos los cuidados postoperatorios necesarios. A las 6 semanas se sacrificó al animal y se procesaron las muestras que finalmente fueron teñidas mediante la tinción de Azul de Stevenel y observadas mediante microscopía óptica (Nikon eclipse 90i, Nikon Instruments Inc, Melville, NY, USA).

### 3.6. ESTUDIO PRINCIPAL SOBRE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para la realización del presente trabajo se ha seguido la guía ARRIVE para la presentación de experimentos in vivo en investigación animal (248) con la intención de conseguir un estudio más reproducible y una adecuada comunicación de los hallazgos.

#### 3.6.1. Animales de experimentación

El estudio se llevó a cabo en un modelo animal cuyo protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, España (Ref.:003/18) y autorizado por la Junta de Extremadura (nº de expediente: 20180216). Este estudio experimental cumple por tanto las condiciones éticas y legales establecidas en el R.D. 53/2013 de 1 de Febrero de la Unión Europea para el cuidado animal y la experimentación. El estudio se ha realizado en el servicio de animales del laboratorio del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (REGA: ES 100370001499). La intervención quirúrgica de los animales se realizó en un quirófano de cirugía experimental del centro, asistida por personal experimentado y cualificado en el manejo de animales de experimentación.

Se emplearon 8 conejos (especie cunícola) de la raza Neozelandesa (Tabla 7), que no habían sido utilizados previamente en ningún otro procedimiento. Los conejos eran de sexo masculino y tenían 5 meses de edad, con un peso medio de 6.1 kg (5.8-6.4 kg). Los animales cumplieron un período de aclimatación de 21 días para evitar complicaciones debidas al estrés del viaje, neofobia, etc. que podrían alterar los resultados del estudio. Se les mantuvo con unas condiciones climáticas adecuadas (temperatura: 20-24°C, humedad: 55% con quince renovaciones de aire por hora, y ciclos de luz-oscuridad de 12-12h con control de la intensidad), sin excesivo ruido y con una dieta estandarizada (pienso y heno) y agua a demanda (*ad libitum*). Cada animal permaneció en una jaula individual de 40 cm de altura, 4670 cm<sup>2</sup> de superficie y con una plataforma elevada que permite la ocultación del animal.

Código	Identificación	Peso (Kg)	Fecha de cirugía
R18-001	941000018931183	6	01/02/2018
R18-002	941000018931187	5,9	01/02/2018
R18-003	941000018931129	6,2	01/02/2018
R18-006	941000018931191	6	02/02/2018
R18-007	941000018931138	6	02/02/2018
R18-008	941000018931158	6,1	02/02/2018
R18-009	941000018931163	5,8	02/02/2018
R18-010	941000018931109	6,4	02/02/2018

Tabla 7: Identificación y peso en kilogramos de los animales que formaron parte del estudio.

### 3.6.2. Anestesia

Para la cirugía, los conejos fueron premedicados mediante la administración de medetomidina 0,8 mg/kg (Domtor<sup>®</sup>, Pfizer S.A., Madrid, España) y ketamina 5 mg/kg (Ketolar<sup>®</sup>, Pfizer S.A., Madrid, España) intramuscular. La anestesia fue inducida con propofol (Diprivan<sup>®</sup>, Zeneca Farma S.A., Pontevedra, España) (4 mg/kg) vía intravenosa. El mantenimiento anestésico se realizó mediante anestesia inhalatoria con sevoflurano (Sevorane<sup>®</sup>, Abbott Laboratories S.S., Madrid, España) a una concentración fijada en el vaporizador de 1,1-1,2%. (Fig. 31)

Además, se puso anestesia local mediante hidrocloreuro de articaína por vía infiltrativa en la zona intervenida (Ultracain<sup>®</sup> con epinefrina 40/0,01mg/ml. Solución inyectable; Laboratorios Normon S.A., Madrid, España).

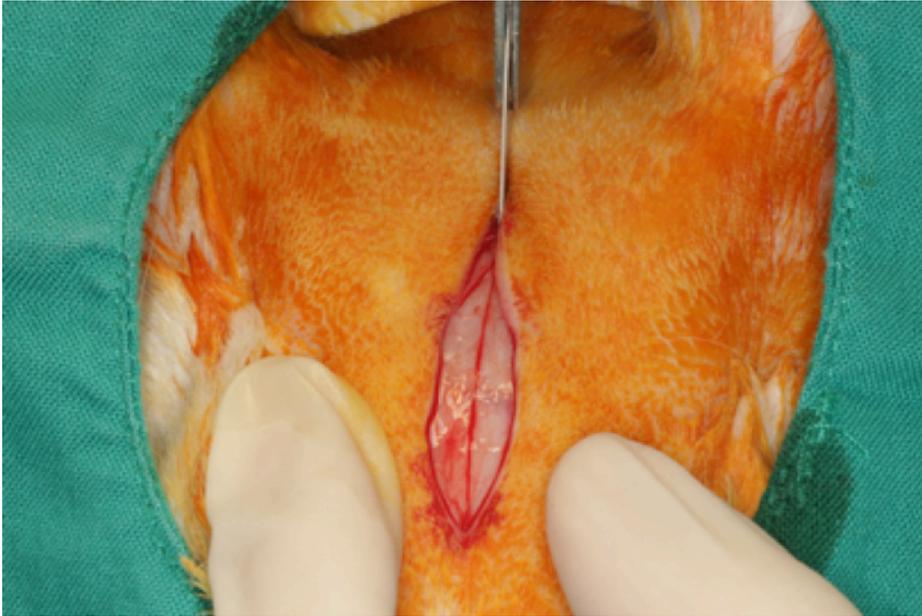
Durante la duración del estudio se administró infusión continua de Lactato Ringer (Ringer Lactato<sup>®</sup>, Braun) (5-10 mg/kg) a través de la vena marginal de la oreja.



*Fig. 31: Conejo New Zealand empleado para el presente estudio, anestesiado y con la zona a intervenir rasurada.*

### **3.6.3. Protocolo quirúrgico**

Tras rasurar y desinfectar con povidona yodada la piel de la cabeza del animal, se realizó una incisión de unos 4,5 cm en la zona medial de la cabeza y se elevó un colgajo mucoperióstico exponiendo los huesos de la calota. (Fig. 32)

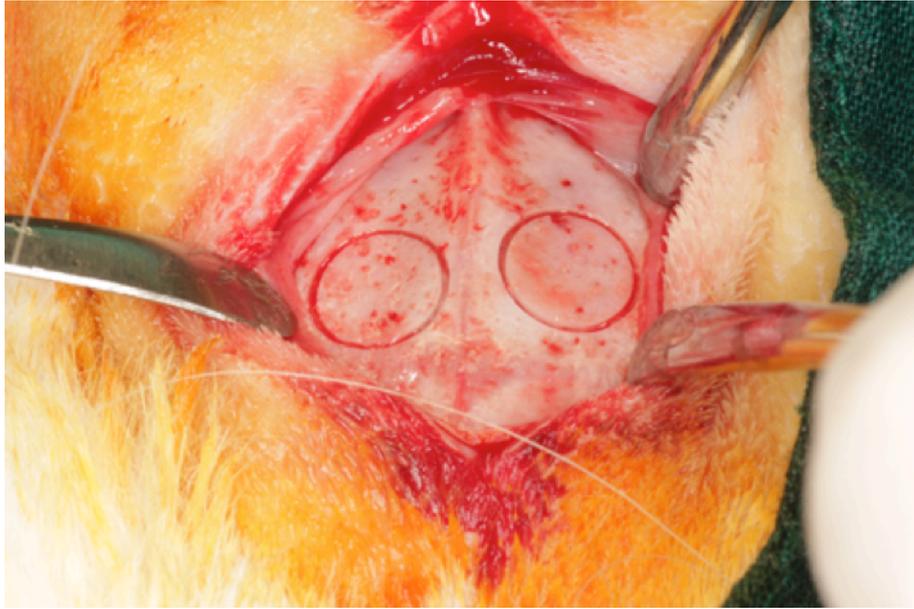


*Fig. 32: Incisión en la zona medial de la cabeza del animal.*

Se realizaron dos osteotomías circulares estandarizadas de 0,5 mm de profundidad y 8 mm de diámetro exterior, una en cada hueso parietal, a ambos lados de la sutura sagital. Se empleó para tal fin una fresa trefina con tope de profundidad y profusa irrigación con suero fisiológico, manteniendo intacta la cortical interna del hueso craneal. (Fig. 33 y 34)

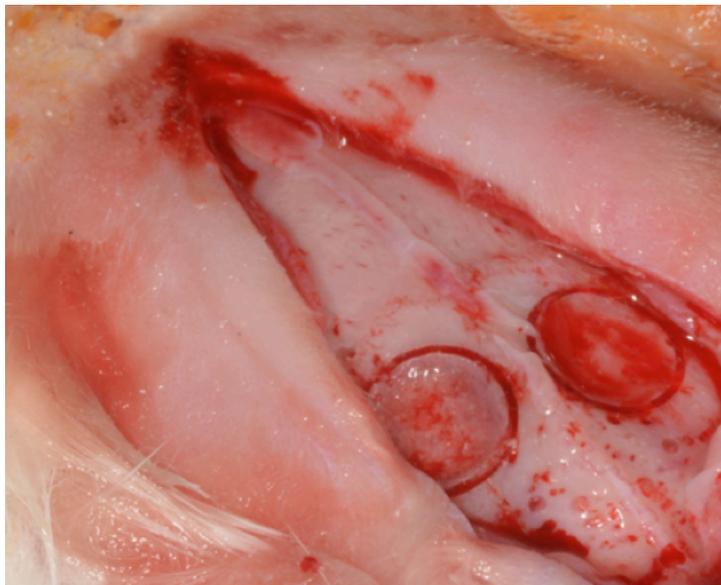


*Fig. 33: Realización de osteotomías circulares con trefina de 8 mm de diámetro con tope para permitir una perforación de 0,5 mm de profundidad.*



*Fig. 34: Imagen tras la realización de las osteotomías bilaterales.*

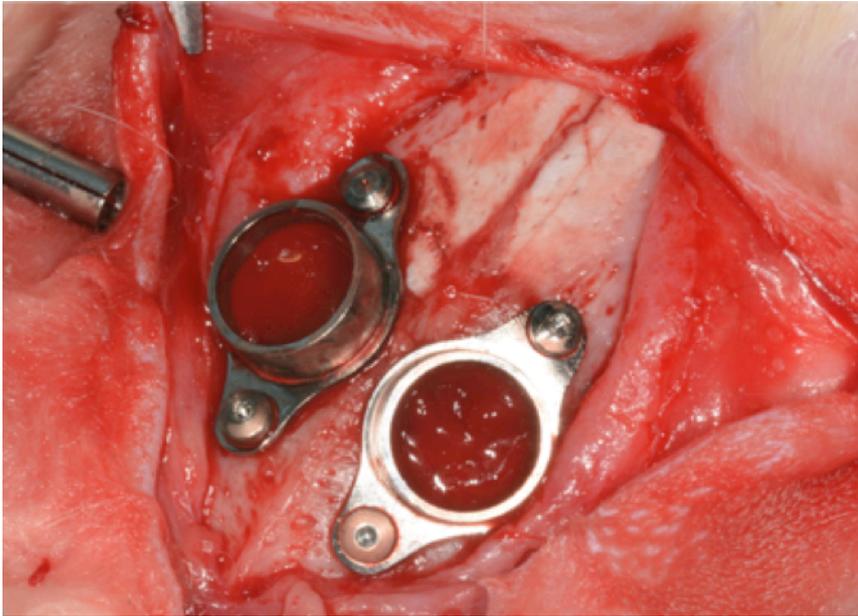
Se eliminó la cortical externa de las preparaciones anteriores con una fresa redonda de carburo de tungsteno (HM141F 031, Meisinger, Neuss, Alemania) para pieza de mano. (Fig. 35)



*Fig. 35: Imagen tras la realización de la decorticalización.*

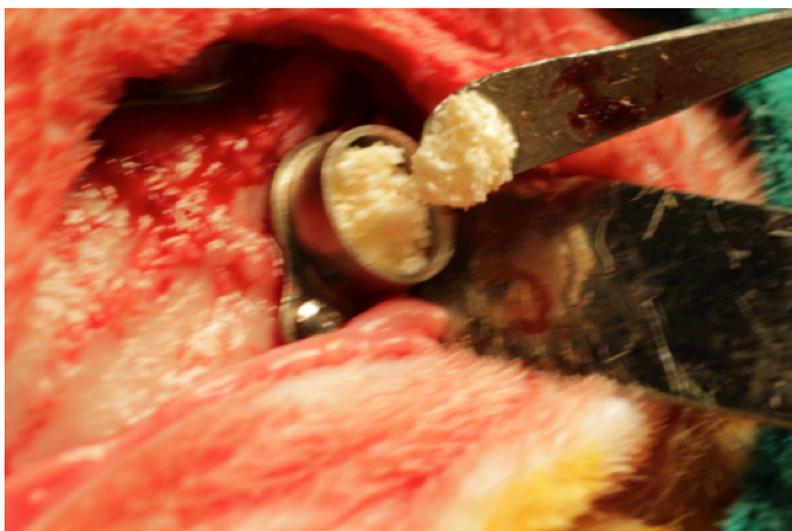
Con la ayuda de chinchetas (Bone Management Master-Pin-Control<sup>®</sup>, Meisinger, Neuss, Alemania), se fijaron unos cilindros diseñados expresamente para este estudio (Soadco S.L.,

Escaldes-Engordany, Andorra) que dieron como resultado dos defectos acotados de 6,9 mm de diámetro y 4 mm de altura. (Fig. 36)



*Fig. 36: Cilindros firmemente fijados en la calota del animal con la ayuda de las chinchetas.*

Ambos defectos se rellenaron con  $0,13 \pm 0,01$  gramos de hidroxiapatita de origen bovino particulado (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm), equilibrado con 1 ml de suero fisiológico (Fig. 37 y 38). El pesaje del material se realizó mediante una báscula de precisión SBS-LW-2000A-2000g (Steinberg Systems, Zielona Góra, Polonia) con una precisión de 0,01 g.



*Fig. 37: Deposito del material de injerto óseo particulado en el defecto.*

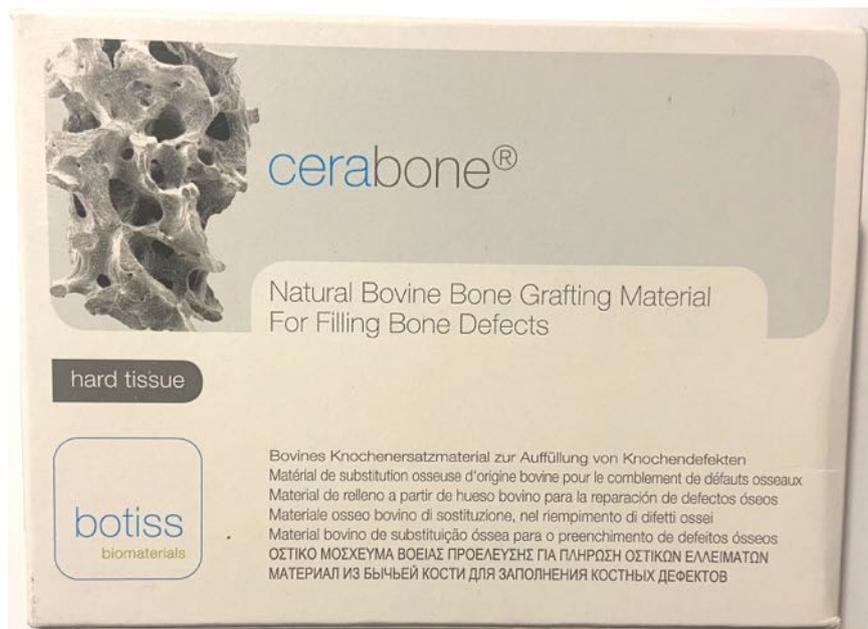
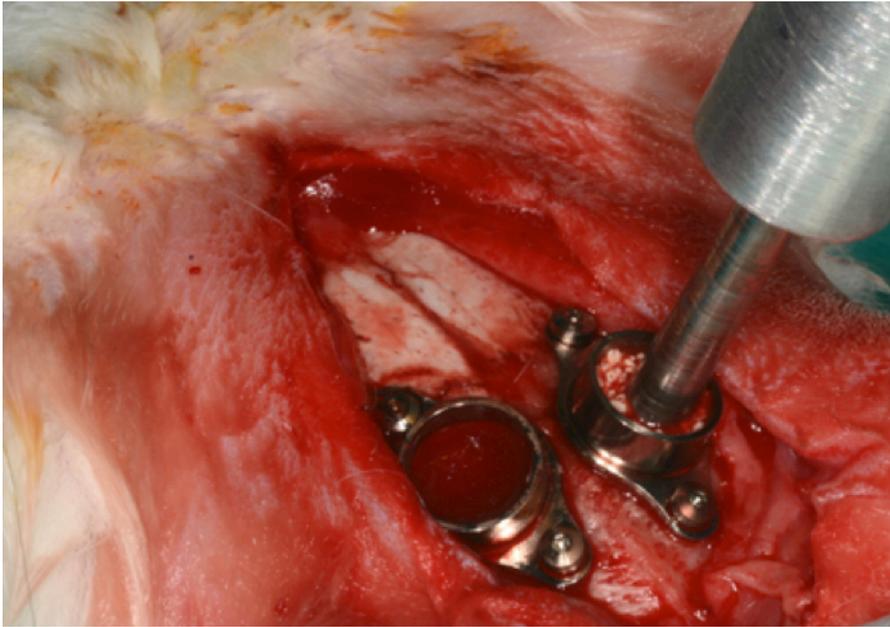


Fig. 38: Injerto óseo. Hidroxiapatita de origen bovino particulado (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm). La porosidad (macroporosidad) de la cerámica está en un rango de 65-80% en volumen, con un diámetro de poros que oscila entre 100 y 1500  $\mu\text{m}$ .

A continuación, se comprimió el biomaterial mediante 5 compresiones a 82 gramos-fuerza (gf, sistema técnico de unidades) en el defecto del parietal derecho y mediante 5 compresiones a 186 gf en el defecto de la izquierda. Éstas fuerzas de compresión tienen relación con las más habitualmente ejercidas en clínica sobre el material de regeneración ósea particulado según el estudio previo realizado con 8 clínicos experimentados y habituados a técnicas de regeneración (ver apartado 3.1 y 4.1).

Con estas fuerzas (82 y 186 gf ó 0,80 y 1,82 Newtons respectivamente), teniendo en cuenta la superficie de la parte activa del instrumento (3,9 mm), podemos saber la presión que se ejerce sobre el material. La presión probada por tanto es de 0,7 Kg/cm<sup>2</sup> (derecha) y 1,6 Kg/cm<sup>2</sup> (izquierda).

Para el control de la fuerza aplicada durante la compactación, se utilizó el compactador (Fig. 39 y 40) descrito previamente y desarrollado específicamente para ésta línea de investigación (ver apartado 3.2 y 4.2).

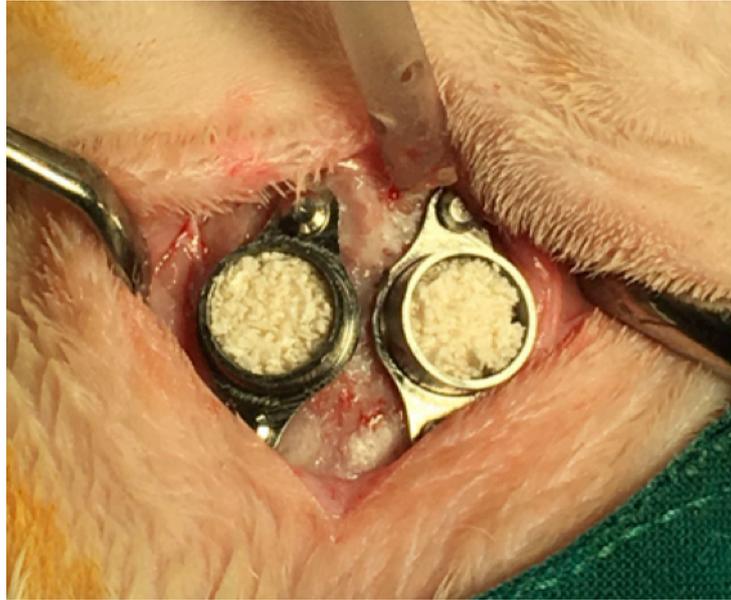


*Fig. 39: Compresión del biomaterial particulado en el defecto con el compactador diseñado específicamente para este fin.*

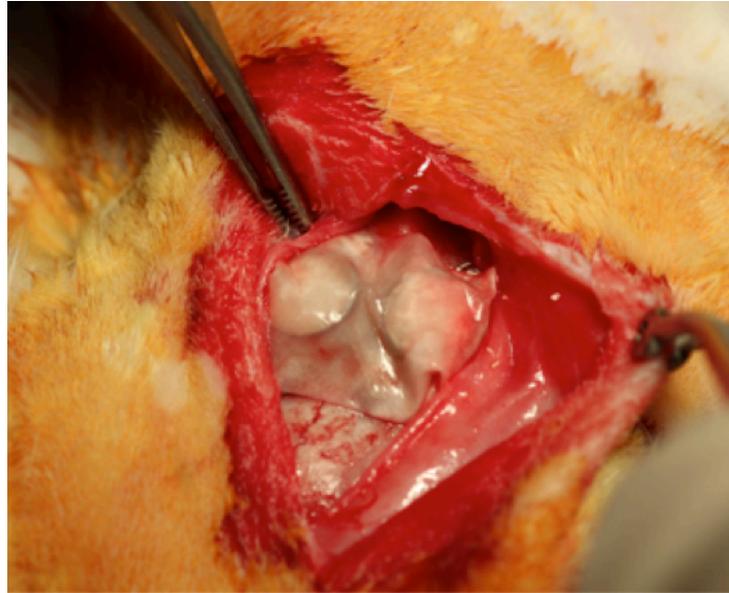


*Fig. 40: Compresión del biomaterial particulado en el defecto con el compactador diseñado. Vista completa del instrumento.*

Tras el procedimiento descrito (Fig. 41), ambos defectos se cubrieron con una membrana reabsorbible de pericardio porcino de 30 x 40 mm (Jason<sup>®</sup> membrane, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) (Fig. 42-43).



*Fig. 41: Imagen de los defectos rellenos con  $0,13 \pm 0,01$  gramos de hidroxapatita de origen bovino particulado (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm) comprimido con fuerzas estandarizadas.*



*Fig. 42: Colocación de una membrana de colágeno para cubrir ambos defectos y permitir la ROG.*



Fig. 43: Membrana de colágeno de pericardio porcino de 30 x 40 mm (Jason® membrane, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania). Esta membrana se reabsorbe entre las 12 y las 24 semanas según especificaciones del fabricante.

Seguidamente se suturó por capas (Fig. 44), con puntos simples, mediante sutura de 4/0 reabsorbible de 90% de glicolida y 10% de L-lactida (Vicryl 4/0 Ethicon®, Johnson & Johnson International; Somerville, NJ, USA).

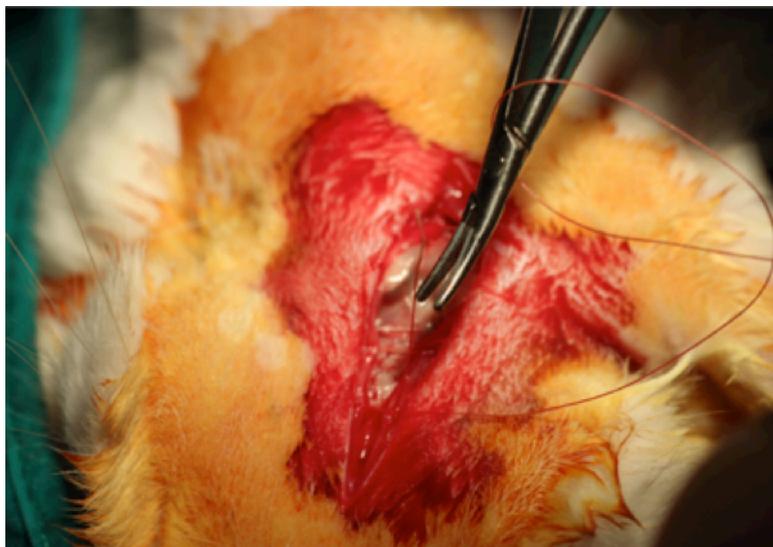


Fig. 44: Imagen de la sutura por capas de herida.

Al finalizar la cirugía se administró a los animales antibioticoterapia, mediante Enrofloxacina, (Baytril<sup>®</sup>, Bayer Hispania S.L., Barcelona, España) 10 mg/Kg /12h 5 días y analgesia mediante Buprenorfina (Buprex<sup>®</sup>, RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, Reino Unido) 0,05 mg/kg 1/8h 3 días, ambos por vía subcutánea. Los animales recibieron todos los cuidados necesarios y se mantuvieron en observación diaria para descartar posibles síntomas o signos de dolor, fiebre y/o infección.

El procedimiento realizado, se considera un procedimiento de riesgo moderado. Se llevó a cabo la observación diaria del animal atendiendo a la escala de valoración de dolor en el conejo que comenzó a controlarse desde el día siguiente a la intervención y durante toda la permanencia del animal en el estudio. Se llevó a cabo un registro diario de la ingesta del animal y del consumo de agua. En este registro se valoraron también cambios en el aspecto o comportamiento espontáneo.

El protocolo establecía que en el caso de que la puntuación obtenida en la escala de control del dolor post-operatorio se encontrase comprendida entre 4 y 14, se instauraría el tratamiento necesario atendiendo a las buenas prácticas veterinarias.

#### **3.6.4. Eutanasia, preparación de los especímenes y análisis histomorfométrico**

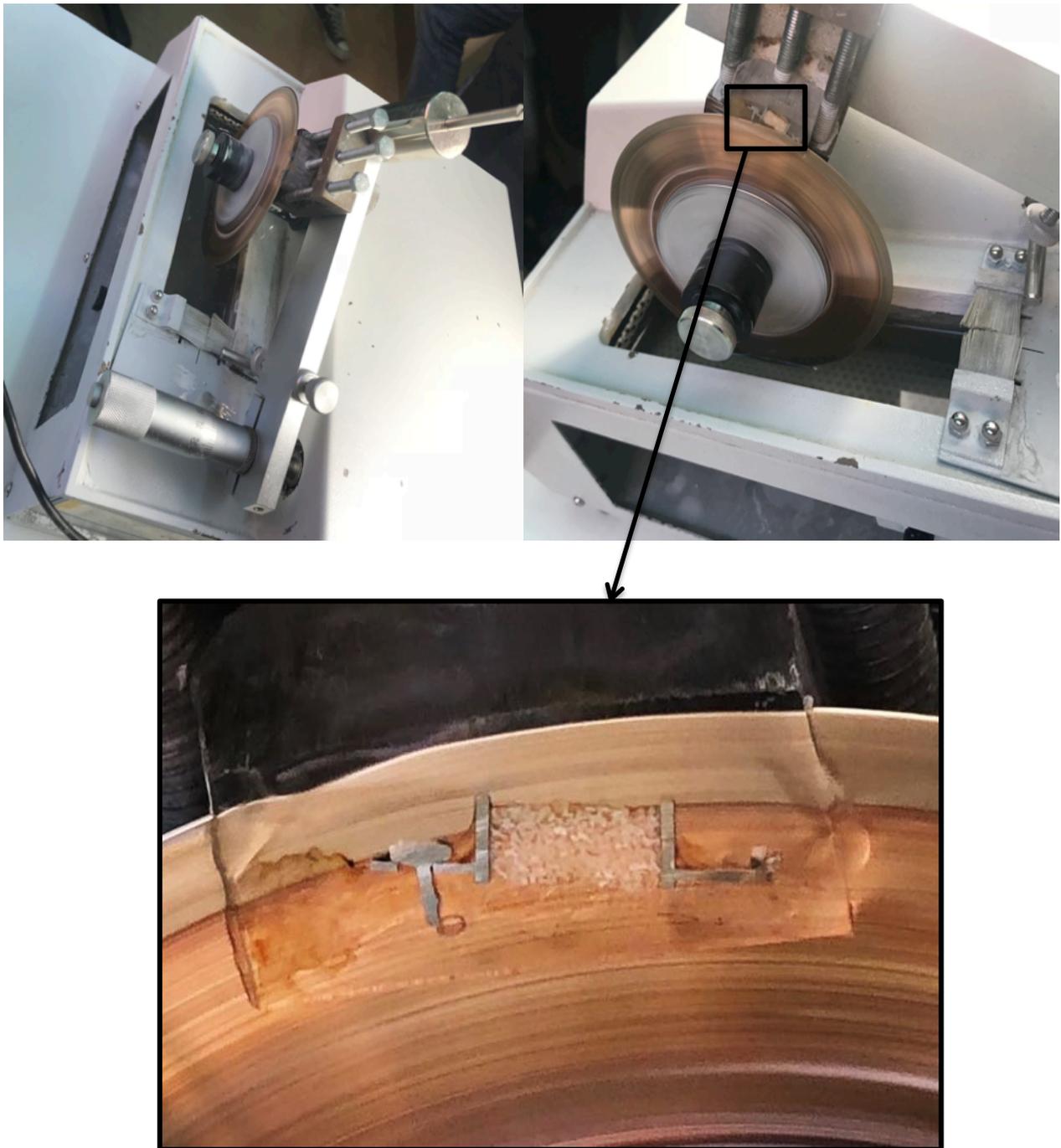
Todos los animales sobrevivieron durante el periodo de cicatrización y a las 6 semanas de la cirugía se les sacrificó mediante una inyección intravenosa de cloruro potásico (Braun<sup>®</sup>, Braun Medical S.A., Barcelona, España), 1-2 mmol/kg, una vez que éstos estuvieron bajo anestesia general.

Se seccionaron los segmentos óseos que contenían cada cilindro con adecuados márgenes de seguridad. El abordaje fue igual que para la cirugía de creación del defecto, un corte longitudinal desde la altura de los ojos hasta la cresta occipital en la zona media del cráneo. Se utilizó un bisturí, un periostótomo y una sierra oscilante para cortar las muestras. El margen de seguridad que se dejó fue el mayor posible siendo de más de 2 mm en los lados craneal, caudal y distal, mientras que medialmente fue el punto medio entre ambos defectos.

Las muestras se fijaron (etanol 96°) y a continuación se deshidrataron mediante inmersión en soluciones de etanol de graduación creciente. Posteriormente las muestras no

descalcificadas fueron incluidas en metilmetacrilato. Una vez polimerizadas, se cortaron las muestras por la zona central del cilindro en su eje axial con un microtomo de baja velocidad (Isomet Low Speed, Buehler<sup>®</sup>; Lake Bluff, Illinois, EEUU) mediante un disco de corte de borde diamantado (Fig. 45 y 46). Las secciones obtenidas (100  $\mu\text{m}$ ) se tiñeron mediante la tinción histológica de Azul de Stevenel (Fig. 47). La valoración histológica de las secciones obtenidas se llevó a cabo mediante un microscopio óptico (Nikon eclipse 90i, Nikon Instruments Inc, Melville, Nueva York, EEUU) con una máquina fotográfica acoplada (Nikon digital Sight DS-SMC, Nikon Instruments Inc, Melville, Nueva York, EEUU). El análisis histomorfométrico se realizó con el Software Meta Imaging Series 6.1 (MetaMorph<sup>®</sup>, Molecular Devices LLC, San Jose, California, EEUU). (Fig. 48)

El Procesado Histológico y el estudio de las muestras se realizó en el Departamento de Anatomía e Histología Humana de la Universidad de Salamanca, con la colaboración de la Doctora Lorena Benito Garzón del Departamento de Cirugía de la misma Universidad.



*Fig. 45: Imágenes del corte de las muestras a baja velocidad con un microtomo (Isomet Low Speed, Buehler®; Lake Bluff, Illinois, USA) mediante un disco diamantado.*



*Fig. 46: Restos del corte de una muestra embebida en metilmetacrilato.*



*Fig. 47: Varias muestras tras el corte, pulido, fijación y tinción.*



*Fig. 48: Imagen del microscopio óptico (Nikon eclipse 90i, Nikon Instruments Inc, Melville, NY, USA) con la máquina fotográfica acoplada (Nikon digital Sight DS-SMC, Nikon Instruments Inc, Melville, NY, USA) empleado para el estudio de las muestras.*

Los resultados se analizaron dividiendo cada muestra a analizar en dos regiones de interés. Cada región de interés medía 6,9 mm de anchura x 2 mm de altura. La región de interés 1 (ROI1) hace referencia a la zona que abarca los 2 milímetros del defecto más cercanos a la calota o hueso parietal nativo y la región de interés 2 (ROI2) a los 2 milímetros superiores del defecto, los más alejados de la calota (Fig. 49).

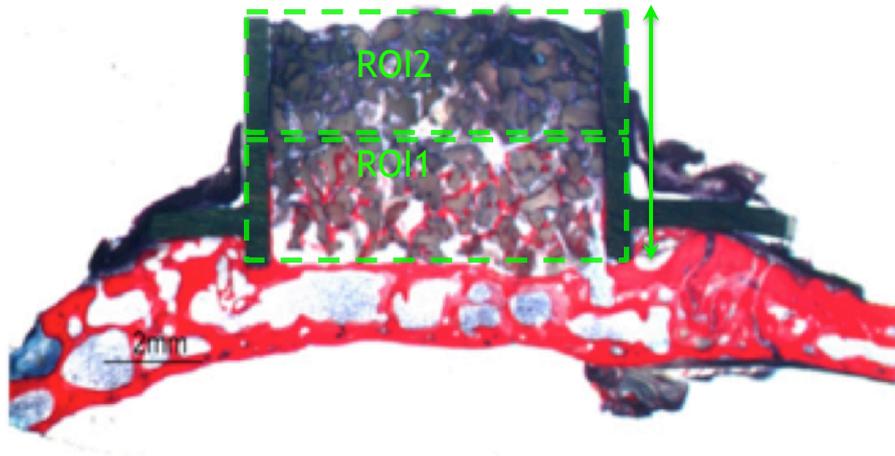


Fig. 49: Esquema de las Regiones de interés (ROI) en las que se divide la muestra para su estudio. ROI1 representa la región del defecto más cercana a la calota o hueso parietal nativo 6,9 x 2 mm y ROI2 representa la región del defecto más alejada de la calota 6,9 x 2 mm.

Las variables a analizar fueron:

- El porcentaje de neoformación ósea (NBF): Porcentaje de nuevo tejido óseo mineralizado formado con respecto al área total de cada región de interés.
- El porcentaje de contacto entre el nuevo hueso formado y las partículas de biomaterial (BBC): Porcentaje de partículas presentes en cada región de interés en contacto directo con el nuevo hueso formado; corresponde con el porcentaje de osteointegración.
- El número de vasos sanguíneos (BV) y su área (BVA): Se han cuantificado únicamente aquellos vasos cuya luz aparece cortada en transversal y se han desechado los que presentan un corte oblicuo.

### **3.6.5. Análisis estadístico**

Los resultados se recogieron en una base de datos y para su estudio estadístico se usó el software informático GraphPad Prism Version 7.00 para Windows (GraphPad Software Inc, La Jolla, California, EEUU). Por tratarse de un tamaño muestral reducido y debido a la distribución de los datos, se decidió emplear test no paramétricos. Para la comparación entre ambos grupos de estudio (0,7 y 1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) se realizó la prueba de los signos de Wilcoxon. También se usó Wilcoxon para la comparación de los resultados entre las diferentes regiones de interés. Las muestras se consideraron estadísticamente significativas si el valor p fue <0,05.



## **4. RESULTADOS**



#### 4.1. ESTUDIO PARA LA DETERMINACIÓN DEL RANGO CLÍNICO DE PRESIÓN DE COMPACTACIÓN DEL MATERIAL DE INJERTO.

En el estudio para la determinación del rango clínico de presión de compactación del material de injerto se apreciaron diferencias en los valores de las medias de la presión ejercida por los diferentes cirujanos. Los resultados se describen en la Tabla 8. Tras analizar los datos con el programa estadístico SPSS Statistics 22.0 para Windows, se compararon las medias y tras demostrar la no homogeneidad de las varianzas (Levene) se realizaron pruebas post hoc para ver las diferencias de medias entre los cirujanos. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) tras realizar la prueba de contraste T3 de Dunnett entre las fuerzas ejercidas por los diferentes operadores.

Asimismo, los resultados mostraron una diferencia considerable entre la fuerza mínima ejercida que fue de 9 gramos-fuerza (gf) y la máxima que fue de 152 gf. Siendo la media del conjunto de la población muestral de  $53,50 \pm 24,98$  gf. Los resultados de este estudio han sido publicados en una Revista del área de Ingeniería (DYNA) (249).

Operador	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	50	37,6078	15,75827	2,20660	33,1758	42,0399	9,00	72,00
2	50	37,0200	15,48863	2,19042	32,6182	41,4218	10,00	87,00
3	50	65,0600	20,23778	2,86205	59,3085	70,8115	20,00	105,00
4	50	78,8400	31,78265	4,49475	69,8075	87,8725	24,00	152,00
5	50	42,1600	17,11708	2,42072	37,2954	47,0246	13,00	98,00
6	50	67,0400	22,11469	3,12749	60,7551	73,3249	15,00	123,00
7	50	48,0577	18,13718	2,51517	43,0083	53,1071	14,00	91,00
8	50	52,8269	20,31876	2,81770	47,1701	58,4837	19,00	91,00
Total	400	53,5062	24,98996	1,24176	51,0651	55,9473	9,00	152,00

Tabla 8: Resultados del análisis estadístico descriptivo de los ensayos de compresión ejercidos por 8 clínicos experimentados (Unidades expresadas en gramos-fuerza) (249).

## **4.2. DISEÑO Y FABRICACIÓN DE UN INSTRUMENTO PARA LA COMPACTACIÓN DEL BIOMATERIAL.**

Dada la necesidad de conocer con precisión la fuerza ejercida en la compactación del xenoinjerto particulado se desarrolló un instrumento para tal fin. El instrumento consta de tres piezas (cilindro, vástago y tapa) y un muelle. El vástago es una pieza maciza de 7,9 mm de diámetro (Fig. 50A) que se desliza dentro de un cilindro hueco (Fig. 50B) con un diámetro interno de 8 mm. El vástago tiene en un extremo una punta activa circular de 3,9 mm de diámetro, similar a la de algunos compactadores usados en clínica. En el otro extremo tiene un rebaje para poder insertar el muelle y una extensión posterior que queda a la vista (fuera del cilindro hueco) con un sistema de marcaje por rayas. El cilindro hueco por el que se desliza el vástago tiene un extremo roscado para la inserción de la tapa (Fig. 50C). Se trata de una tapa roscada para poder cambiar el muelle si éste perdiese sus propiedades o si fuese necesario conseguir mayores fuerzas de compactación cambiando el muelle o añadiendo topes.

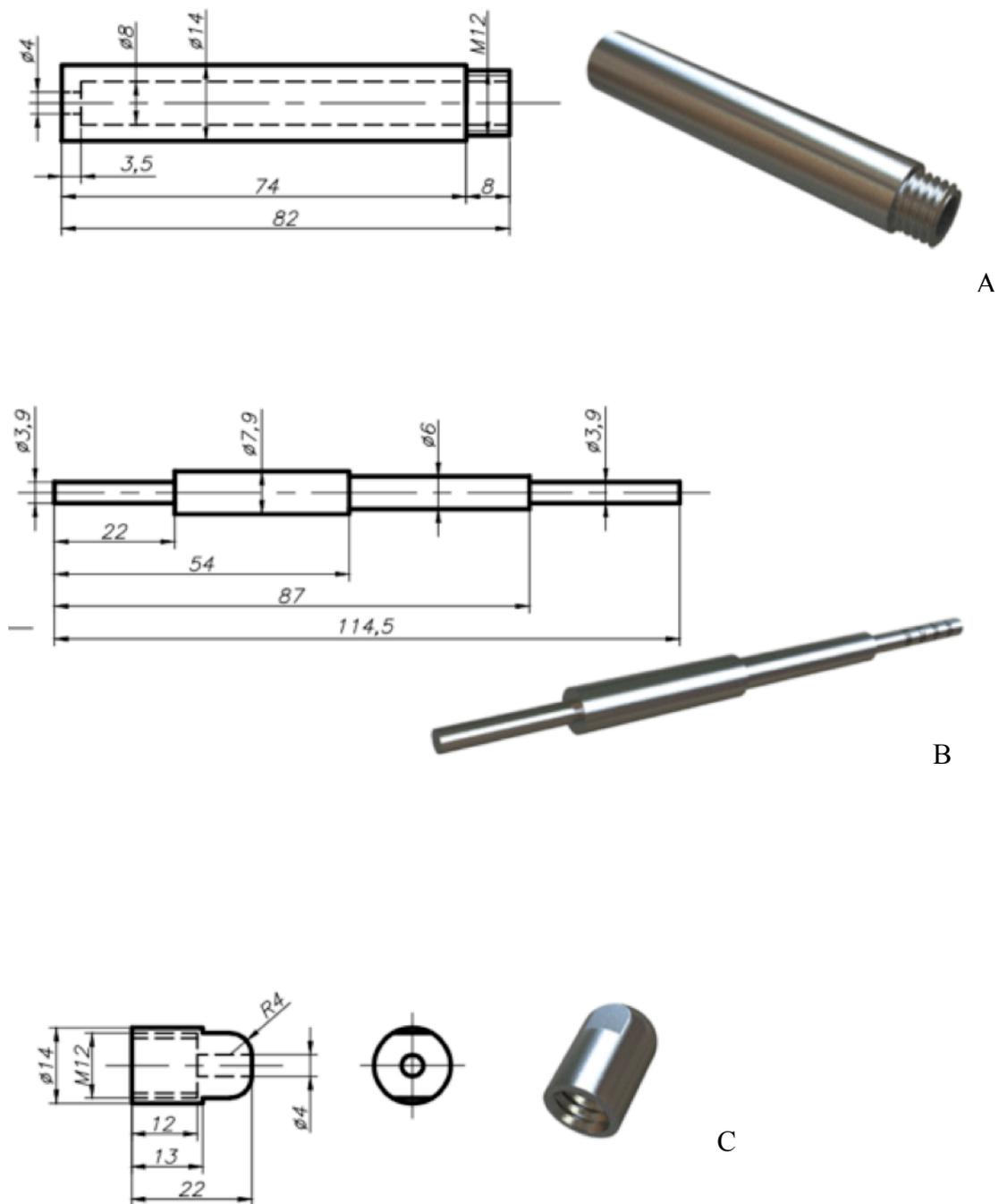


Fig. 50. Plano y reconstrucción 3D en Autocad de las 3 piezas de las que se compone el instrumento de compactación. A: Cilindro, B: Vástago, C: Tapa. Escala 1:1 (249).

El instrumento diseñado basa su funcionamiento en un muelle que se comprime una distancia proporcional a la fuerza que se ejerce sobre él (constante de proporcionalidad o constante elástica del muelle). El muelle puede ser deformado por una fuerza, pero volverá a su forma original una vez ésta cese (deformación elástica), siempre y cuando no sobrepasemos el límite elástico. Se diseñó especialmente para éste estudio un muelle de compresión que cumpliera las características necesarias en cuanto a diseño y rango de fuerzas de compresión, que fueron determinadas en el estudio previo (0-186 gf), (Empresa Muellestock, Barcelona, España. Fig. 51). El muelle actual es de acero inoxidable (EN 10270-3, INOX-AISI 302) con una longitud de 67,55 mm, un diámetro exterior de 7,1 mm y un diámetro interior de 6,1 mm. El diámetro del hilo (espesor) es de 0,5 mm. El muelle tiene 30 espiras con un paso (distancia media entre dos espiras activas del muelle) de 2,37 mm. La constante de proporcionalidad o constante elástica ( $k$ ) del muelle en éste caso es de 0,0076 daN/mm.

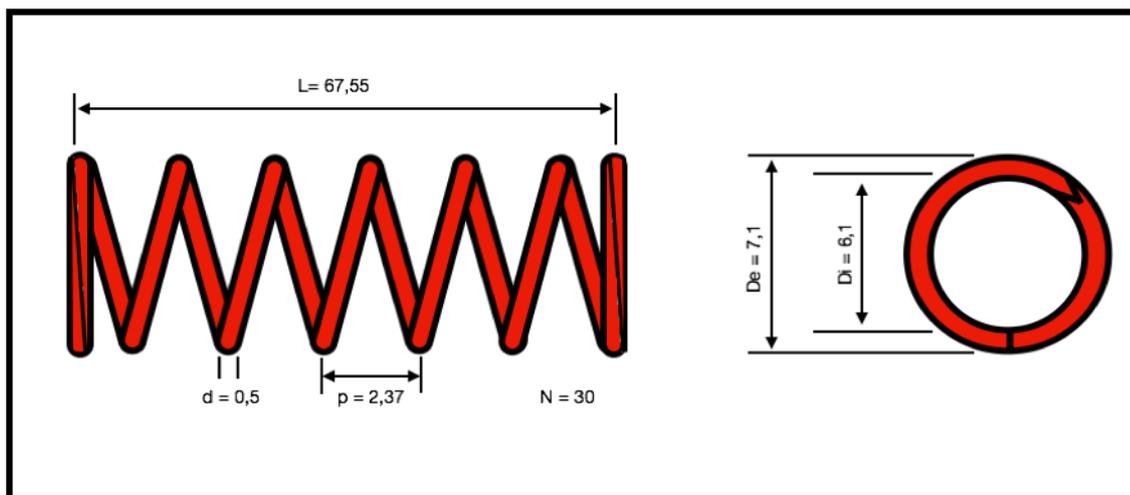


Fig. 51: Características del muelle de compresión responsable de las diferentes fuerzas que ejercemos.  $L$ : Longitud del muelle;  $p$ : paso de la espira;  $d$ : diámetro del alambre;  $De$ : Diámetro exterior;  $Di$ : Diámetro interior;  $N$ : número de espiras. Medidas en (mm).

Una vez diseñado y fabricado el instrumento, se procedió a su calibración, para lo cual se contó con una empresa de calibración independiente (Ac6 Metrología S.L, Navarra, España) acreditada por la ENAC (Entidad Nacional de Acreditación). Se realizó efectuando tres series de medida con valores de fuerza crecientes de compresión mediante comparación con un transductor patrón (Transductor de fuerza HBM, modelo Z 30, nº 09130043). La resolución es de 0,01 gramos-fuerza (gf), siendo 1 gf igual a 0,00980665 Newton. Se fijó el mensurando entre el

inicio de la marca y el final de la misma en cada una de las marcas constatándose que la variación entre el inicio y el final es de aproximadamente 7 gf, (certificado de calibración adjunto en Anexos).

En la Tabla 9 se muestran los resultados de la calibración de las diferentes marcas del vástago.



Línea (L)	$F_N$ (gf)	F media (gf)	c (%)	W (%)
1	58	57,6	-0,69	0,73
2	82	81,9	-0,11	0,45
3	132	131,7	-0,24	0,45
4	186	185,5	-0,27	0,56

Tabla 9: Resultados de la calibración de las diferentes fuerzas que mide éste instrumento.  $F_N$ : Fuerza indicada por el instrumento a verificar para valores de fuerzas crecientes;  $F_{media}$ : Media aritmética de las distintas medidas de  $F$  para un mismo escalón de fuerza;  $c$ : Corrección relativa (valores indicados en %, corresponden a la cantidad que hay que sumar algebraicamente a la lectura del mensurando para obtener la fuerza convencionalmente verdadera);  $W$ : Incertidumbre relativa expandida (La incertidumbre relativa expandida corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95%, se han tenido en cuenta las contribuciones debidas al error relativo de repetibilidad, de cero, de resolución y a los patrones usados en la calibración). (249)

El resultado es un instrumento compactador con manejabilidad clínica en el sector intraoral, capaz de medir la fuerza a la que esta compactando un biomaterial de una forma precisa y calibrada. Por otro lado, está fabricado en acero inoxidable con posibilidad de esterilización mediante autoclavado. Se presenta en la Figura 52 una simulación en 3D para facilitar la comprensión de las características y funcionamiento del instrumento.

El rango de fuerzas que ejerce (0-186 gf) se correlaciona con las más habitualmente usadas en clínica según el estudio realizado previamente con ayuda de 8 cirujanos orales experimentados.



*Fig. 52: Renderización ilustrando el funcionamiento del instrumento. (249)*

Otra de las ventajas del instrumento es que permite generar diferentes rangos de fuerza de compresión dependiendo de los resultados de la futura investigación in vivo o de diferentes demandas, ya que se pueden incorporar muelles con diferentes constantes elásticas ( $k$ ) o topes en el recorrido del muelle.

### 4.3. DESARROLLO DE UN CONTENEDOR QUIRÚRGICO CILÍNDRICO QUE ACOTE EL DEFECTO ÓSEO.

Se desarrolló una pieza que permitiese la contención del biomaterial y su compactación a las fuerzas determinadas. El diseño de los cilindros se muestra detallado en la Figura 53. Sus características deberían permitir una fijación adecuada de los mismos. El defecto que consiguen generar es de 4 mm de altura por 6,9 mm de diámetro resultando en un volumen de  $149,6 \text{ mm}^3$ .

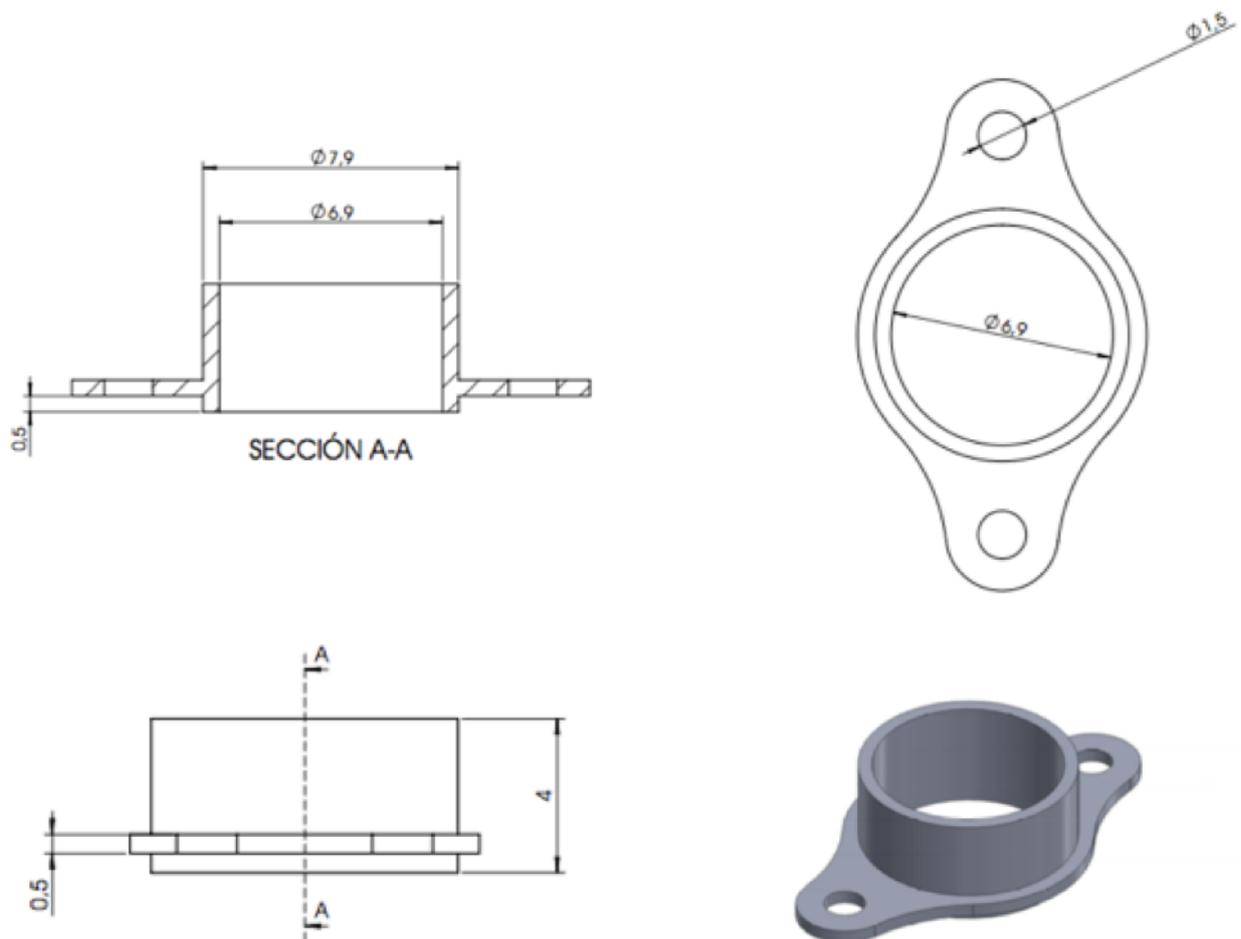


Fig. 53: Planos y reconstrucción 3D del cilindro. Escala 1:1. Los orificios de las aletas del cilindro tienen como objetivo fijar el contenedor a la cortical de la calota, haciendo uso de chinchetas quirúrgicas.

#### 4.4. DETERMINACIÓN IN VITRO DEL EFECTO DE LA COMPRESIÓN DEL MATERIAL MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA Y MICRO-TOMOGRFÍA COMPUTERIZADA (MICRO-CT).

##### 4.4.1. Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microscopía óptica

Con las pruebas de microscopía óptica pudimos observar que tras la realización de diferentes fuerzas de compresión sobre el material se produce una diferente reorganización entre las partículas, con una disminución de espacios libres entre las mismas. (Fig. 54)

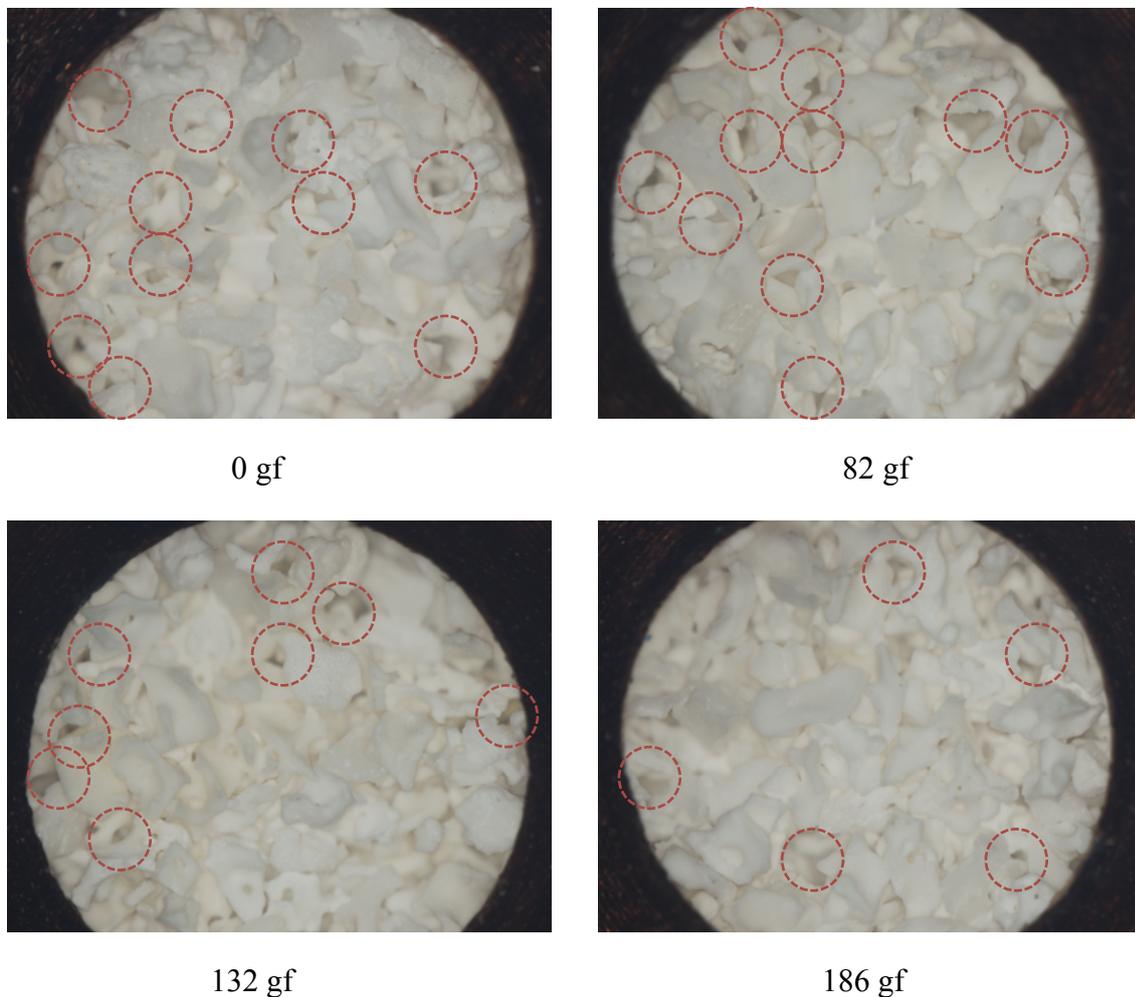
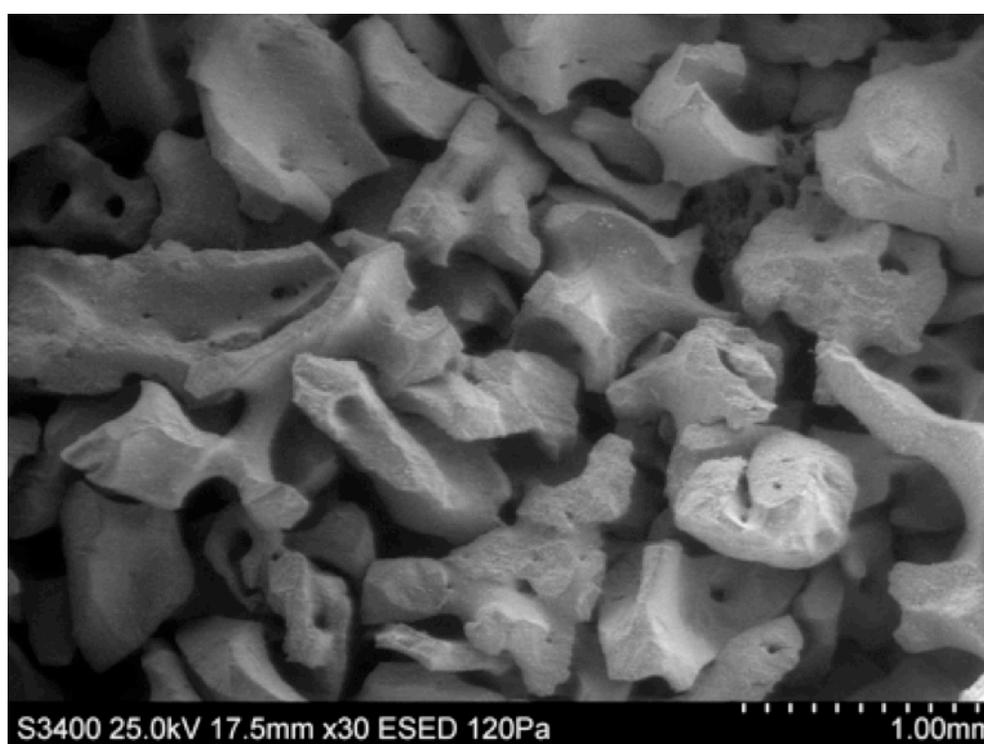


Fig. 54: Imágenes tomadas con un Microscopio óptico (Nikon AZ100; Brighton, USA) de la hidroxiapatita bovina particulada (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm) tras condensarla con diferentes fuerzas de compresión. Se observa una mayor densidad de biomaterial al aumentar la fuerza de compresión. Circulos rojos indican espacios huecos interpartícula observados.

#### **4.4.2. Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La valoración de las muestras mediante SEM permitió observar al detalle las diferentes características morfológicas de este material particulado (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania) de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm) (Fig. 55-57) y la diferente organización de las partículas con las diferentes fuerzas de compresión probadas (Fig. 58). En alguna muestra tras realizar la compresión, se observó fractura de algunas partículas (Fig. 59).



*Fig. 55: Imagen de Cerabone<sup>®</sup> 0,5-1,0 mm a 30 aumentos visto con un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S3400; Tokyo, Japon).*

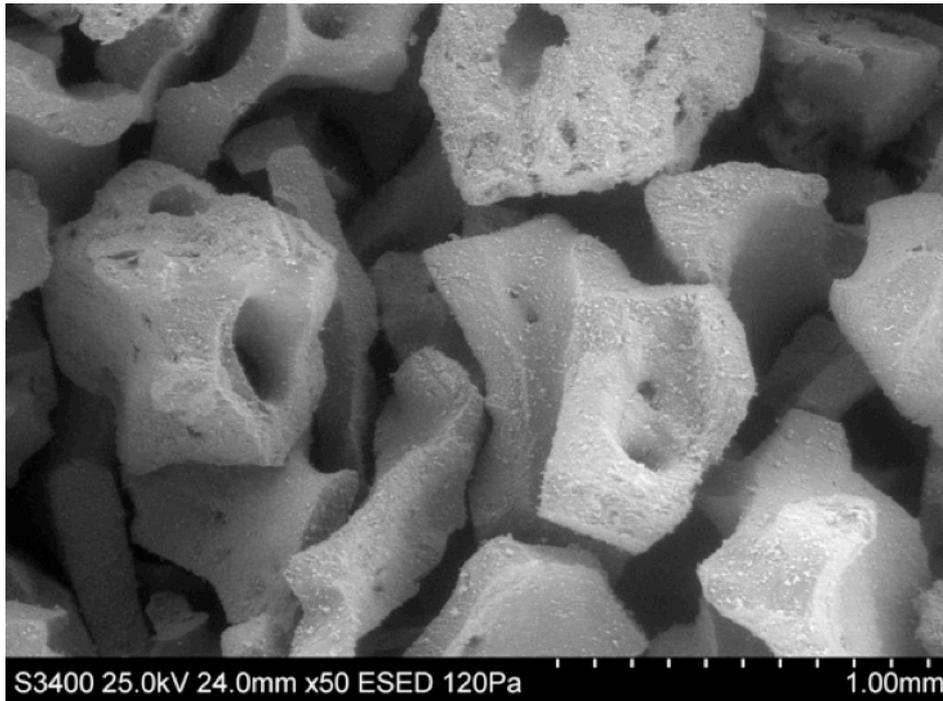


Fig. 56: Imágenes de Cerabone<sup>®</sup> 0,5-1,0 mm a 50 aumentos visto con un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S3400; Tokyo, Japón). Se pueden observar interesantes detalles morfológicos de este material.

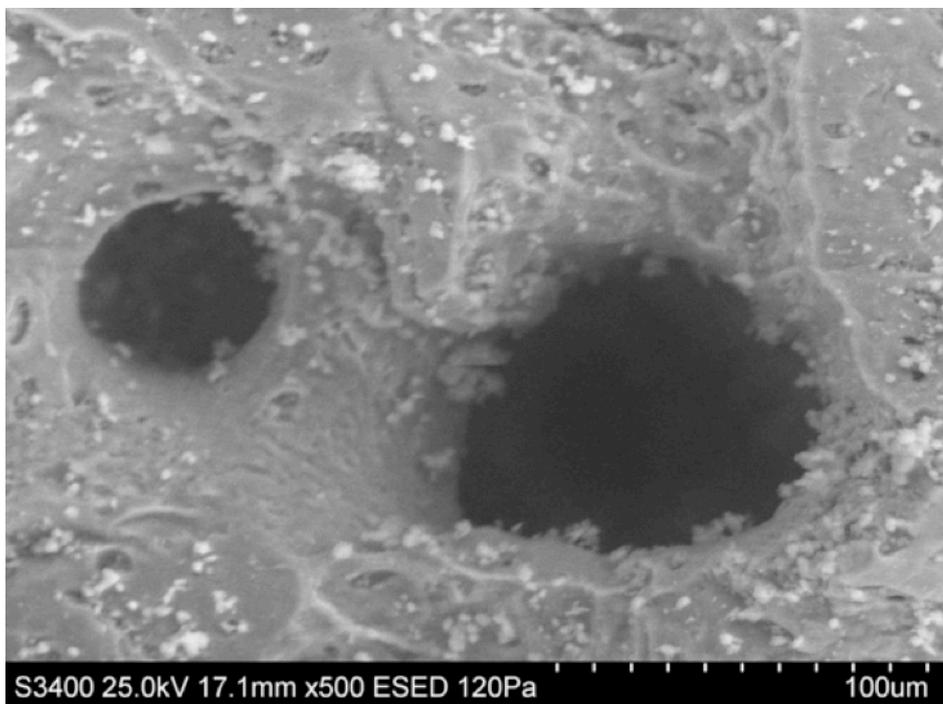
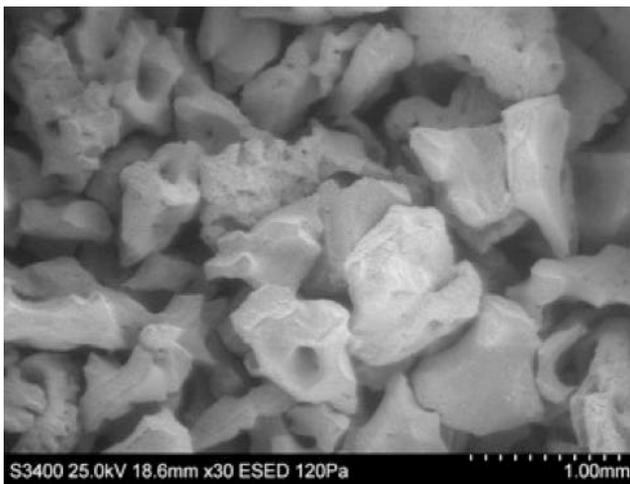
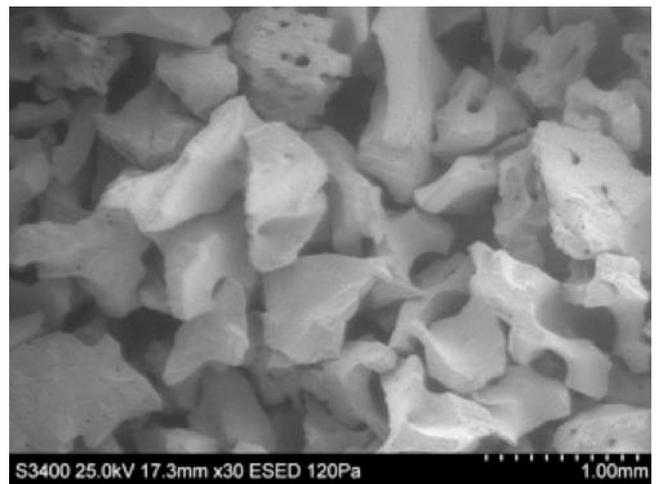


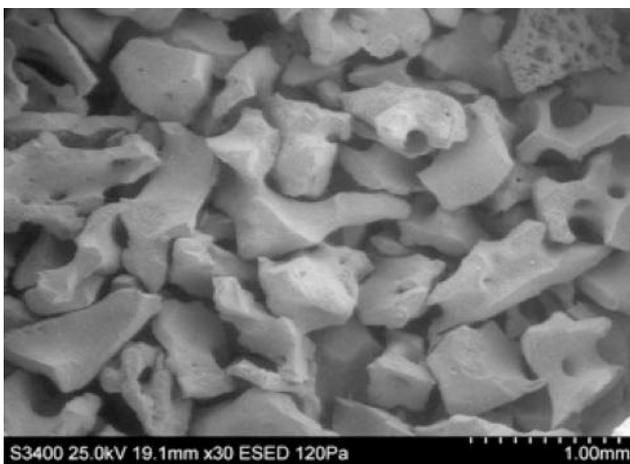
Fig. 57: Imágenes de Cerabone<sup>®</sup> 0,5-1,0 mm a 500 aumentos visto con un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S3400; Tokyo, Japón). Detalle de los poros intraparticulares.



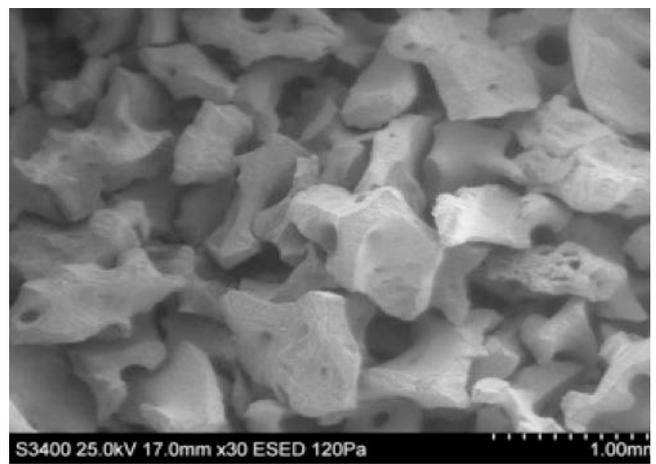
0 gf



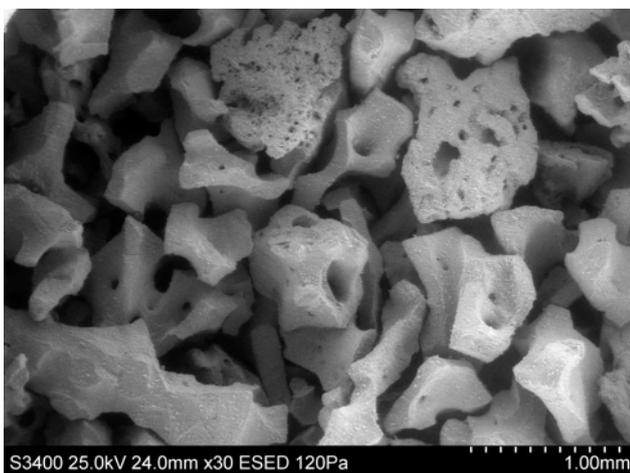
82 gf



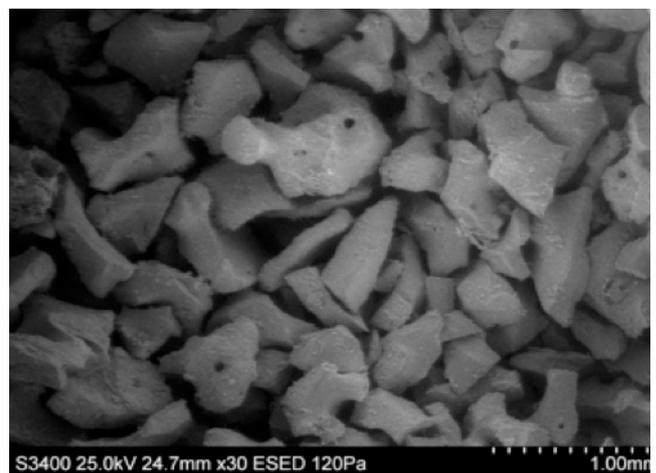
132 gf



186 gf

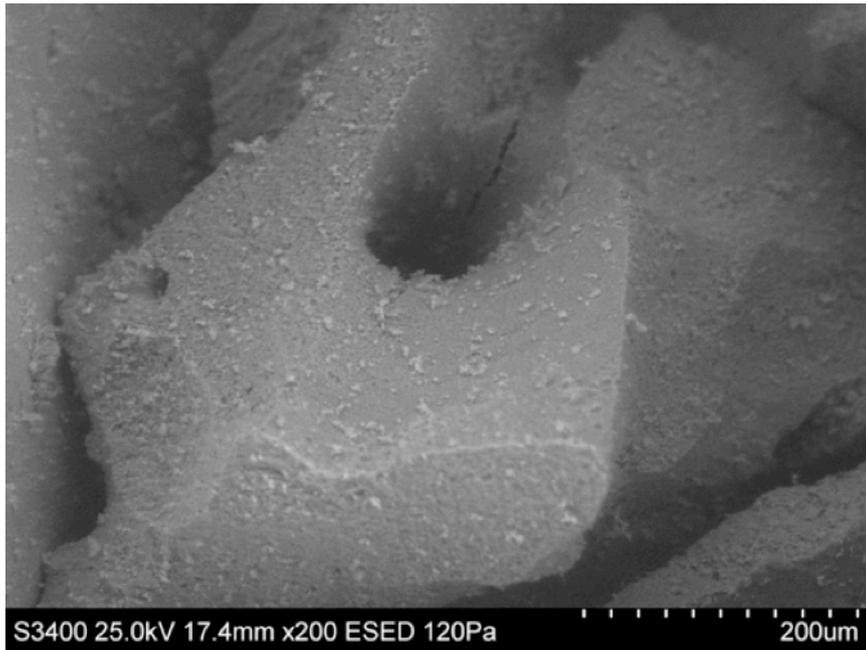


0 gf



342 gf

*Fig. 58: Imágenes de Cerabone<sup>®</sup> 0,5-1,0 mm a 30 aumentos visto con un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S3400; Tokyo, Japón). Se pueden observar diferencias en la reorganización de las partículas con las diferentes fuerzas de compresión empleadas.*



*Fig. 59: Imagen de una microfractura en la partícula de Cerabone® 0,5-1,0 mm captada a 200 aumentos con un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S3400; Tokyo, Japón).*

#### **4.4.3. Estudio del efecto de la presión de compactación mediante técnicas de microtomografía computerizada de alta resolución (micro-CT)**

Los resultados obtenidos anteriormente mediante diferentes técnicas de microscopía no permitían aportar, por su propia idiosincrasia, diferencias cuantificables. A diferencia de ellos, la microtomografía computerizada de alta resolución (SkyScan 1174 de Bruker, Kontich, Bélgica. Fig. 60) si nos aportó resultados cuantitativos.



*Fig. 60: Imagen tomada con un micro-CT (SkyScan 1174 de Bruker, Kontich, Bélgica) del injerto Cerabone® de partícula pequeña (0,5-1,0 mm) con una resolución de 11,8 pixeles y un tiempo de exposición de 8500ms.*

#### **4.4.3.1. Primer análisis**

Se introdujeron en viales de estudio  $0,20 \pm 0,01$  gramos de xenoinjerto particulado de origen bovino (Cerabone® de Botiss Biomaterials GmbH, Dieburg, Alemania) y se sometieron a diversas fuerzas de compactación repetidas veces. Los resultados mostraron diferencias importantes en el volumen y porcentaje de poros entre el injerto de partícula pequeña (0,5-1,0 mm) y el injerto de partícula grande (1,0-2,0 mm). También se observó una leve y no siempre perfectamente correlacionada reducción en la porosidad y en la altura de la muestra al aumentar la fuerza y el número de compresiones. (Tabla 10 y 11; Fig. 61 y 62)

Fuerza (gf)	Comp	Total VOI (mm <sup>3</sup> )	Altura (mm)	Vol. Poro (mm <sup>3</sup> )	% Poro
0	3	119	6,41	66,3	55,8
82	3	121	5,9	66,1	54,5
132	3	122	5,45	67,1	55,1
186	3	128	6,34	67,1	52,6
299	3	137	6,29	72,3	52,7
342	3	134	6,21	70,9	53,1
342	10	106	5,38	52,4	49,4

Tabla 10: Resultados del micro-CT con el injerto de partícula pequeña (Cerabone<sup>®</sup> 0,5-1,0 mm).

Comp: número de compresiones; VOI: Volumen de interés; Vol.: Volumen; gf: gramos-fuerza.

Fuerza (gf)	Comp	Total VOI (mm <sup>3</sup> )	Altura (mm)	Vol. Poro (mm <sup>3</sup> )	% Poro
0	3	217	9,31	147	68,1
82	3	177	7,95	117	66,2
132	3	201	8,72	132	65,7
186	3	208	8,96	138	66,3
299	3	194	8,4	126	64,8
342	3	188	7,9	121	64,6
342	10	153	6,45	93	60,8

Tabla 11: Resultados del micro-CT con el injerto de partícula grande (Cerabone<sup>®</sup> 1,0-2,0 mm).

Comp: número de compresiones; VOI: Volumen de interés; Vol.: Volumen; gf: gramos-fuerza.

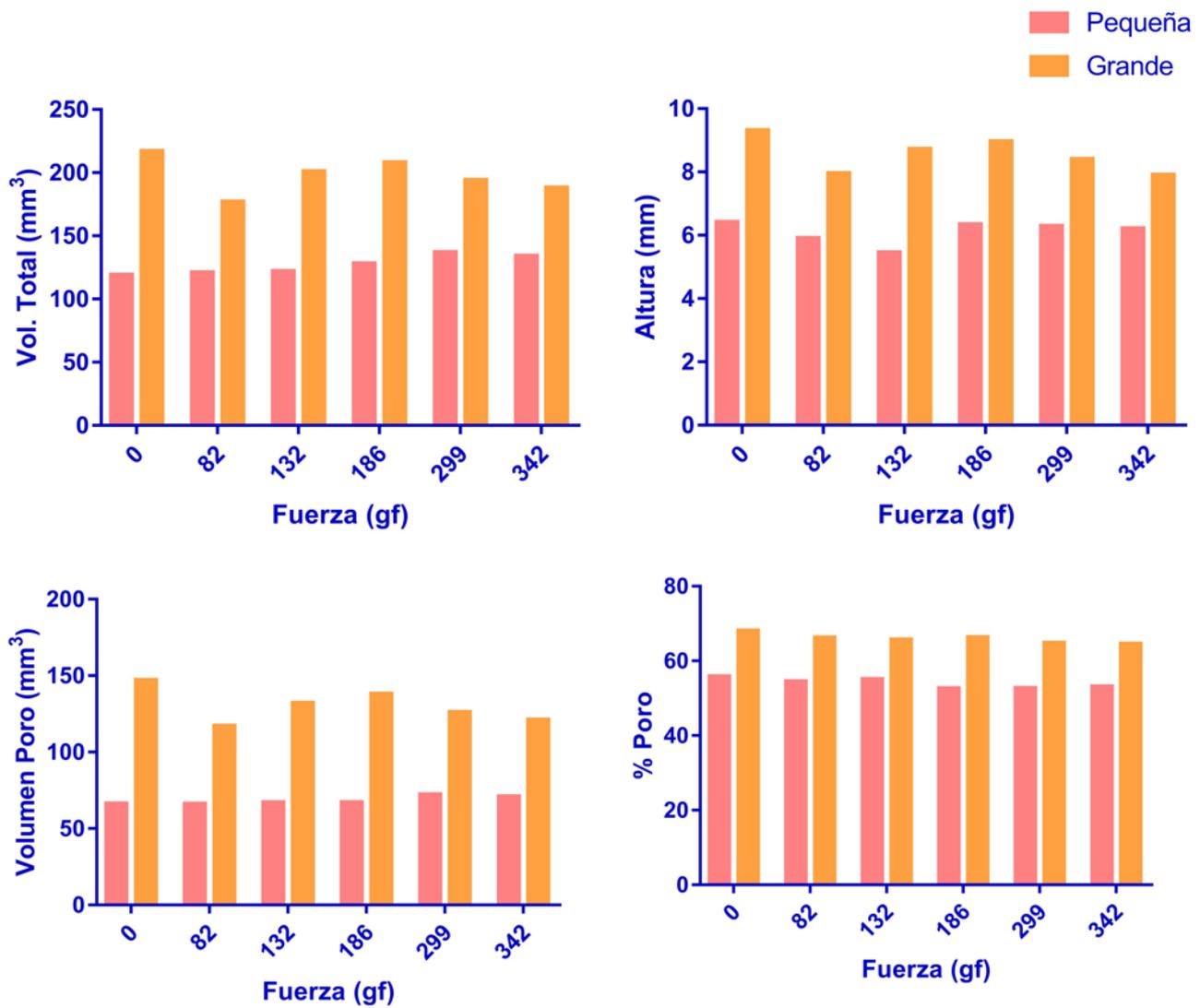


Fig. 61: Gráficas de los resultados obtenidos con el injerto particulado (Cerabone®) de ambos tamaños de partícula. Se observan leves diferencias entre las diferentes fuerzas de compresión realizadas sobre estos materiales.

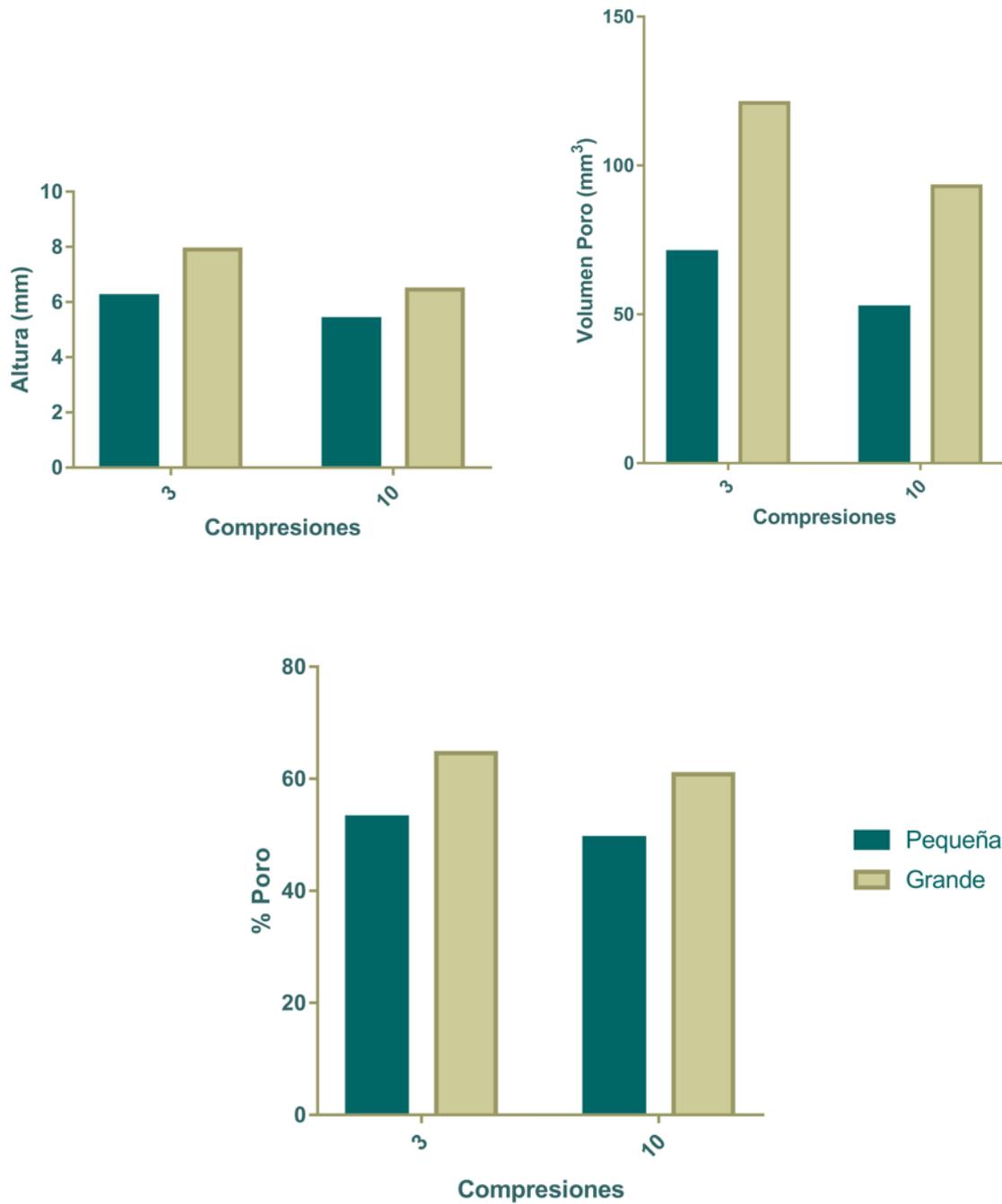


Fig. 62: Gráficas de los resultados obtenidos; en cuanto a altura que ocupan, volumen y porcentaje de poro, con el injerto particulado (Cerabone®) de ambos tamaños de partícula al realizar 3 ó 10 compresiones a 342 gf sobre estos materiales.

#### 4.4.3.2. Segundo análisis

Tras haber observado unas diferencias mínimas en los resultados y debido al diferente volumen inicial observado durante la preparación de las muestras, se realizó un segundo análisis donde se analizaron las mismas muestras ( $0,20 \pm 0,01$  gramos de Cerabone<sup>®</sup> de tamaño de partícula pequeña: 0,5-1,0 mm) antes (0 gf) y después de la compresión (3 compresiones, a 82 gf en una muestra y a 186 gf en otra muestra) para asegurarnos de que los resultados obtenidos únicamente tenían que ver con la compresión.

Los resultados (Tabla 12; Fig. 63 y 64) mostraban una disminución en el volumen total de la muestra y un mayor porcentaje de partículas ocupando la muestra tras la compresión. También se observaron diferencias importantes en el volumen y el porcentaje de poros tras la compresión. Teniendo en cuenta el volumen total de cada muestra, tras la compresión el número de partículas dentro de una misma muestra aumentó lo que implica por necesidad que se produjeron fracturas de algunas de las partículas durante la compactación a prueba (Fig. 59).

Muestra	Fuerza (gf)	Comp	Total VOI (mm <sup>3</sup> )	% Obj. V/TV	Vol. Poro (mm <sup>3</sup> )	% Poro	Nº partículas*
A	0	3	88,11	45,81	47,74	54,18	616
	82	3	86,32	50,24	42,95	49,75	997
B	0	3	74,46	49,97	37,25	50,03	946
	186	3	69,12	55,55	30,72	44,45	1196

Tabla 12: Resultados del micro-CT con  $0,20 \pm 0,01$  gramos de material de xenoinjerto de partícula de tamaño pequeño (Cerabone<sup>®</sup> 0,5-1,0 mm) antes y después de la compresión. Comp: número de compresiones; VOI: Volumen de interés; Vol.:Volumen; gf: gramos-fuerza. % Obj. V/TV: Porcentaje de la muestra que ocupan las partículas de hueso. \* Este valor es el único que se toma sin tener en cuenta el VOI sino el volumen total de la muestra.

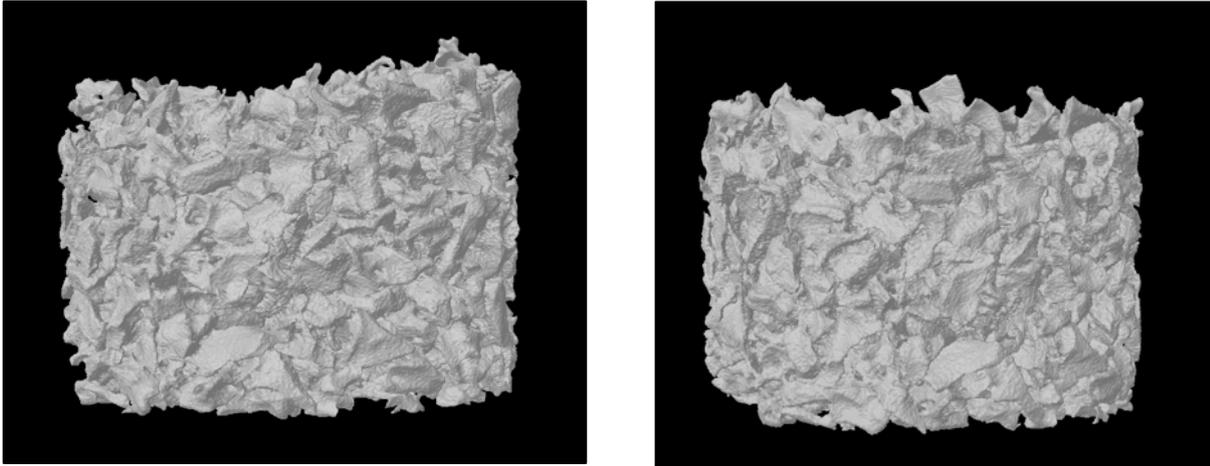


Fig. 63: Reconstrucción tri-dimensional mediante micro-CT. Muestra de Cerabone® de tamaño de partícula pequeña (0,5-1,0 mm) escaneada en el micro-CT (SkyScan 1174 de Bruker, Kontich, Bélgica) antes (izquierda) y después (derecha) de realizar 3 compresiones de 82 gf.

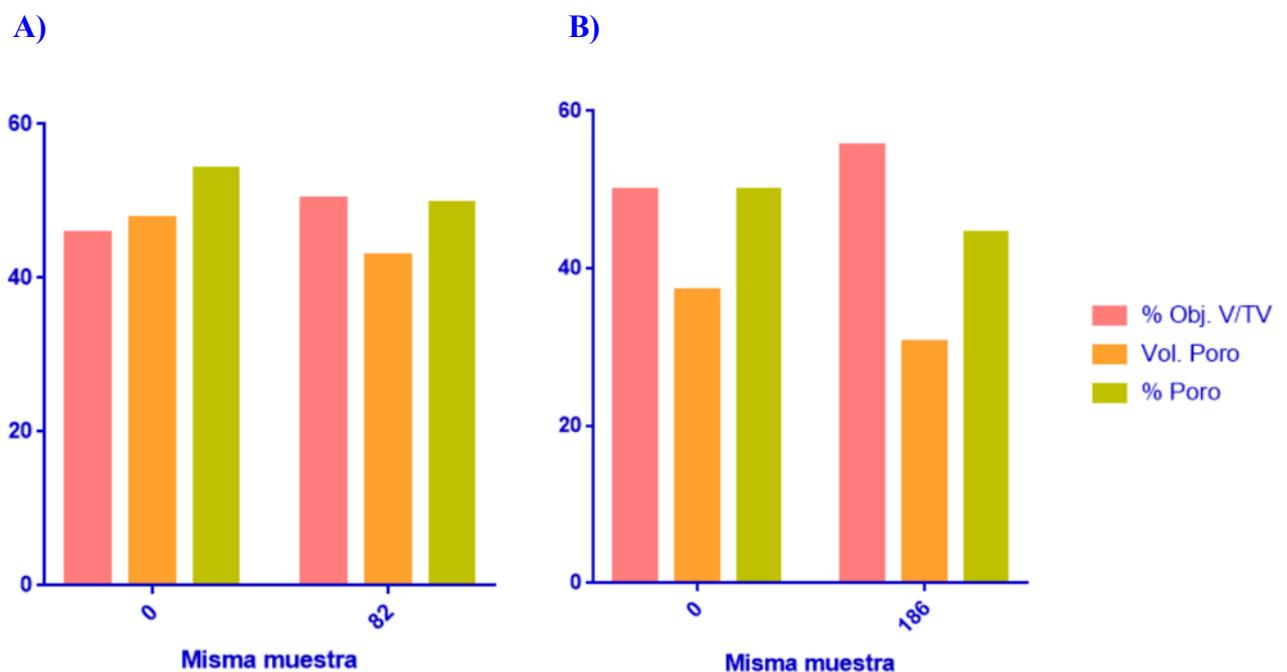


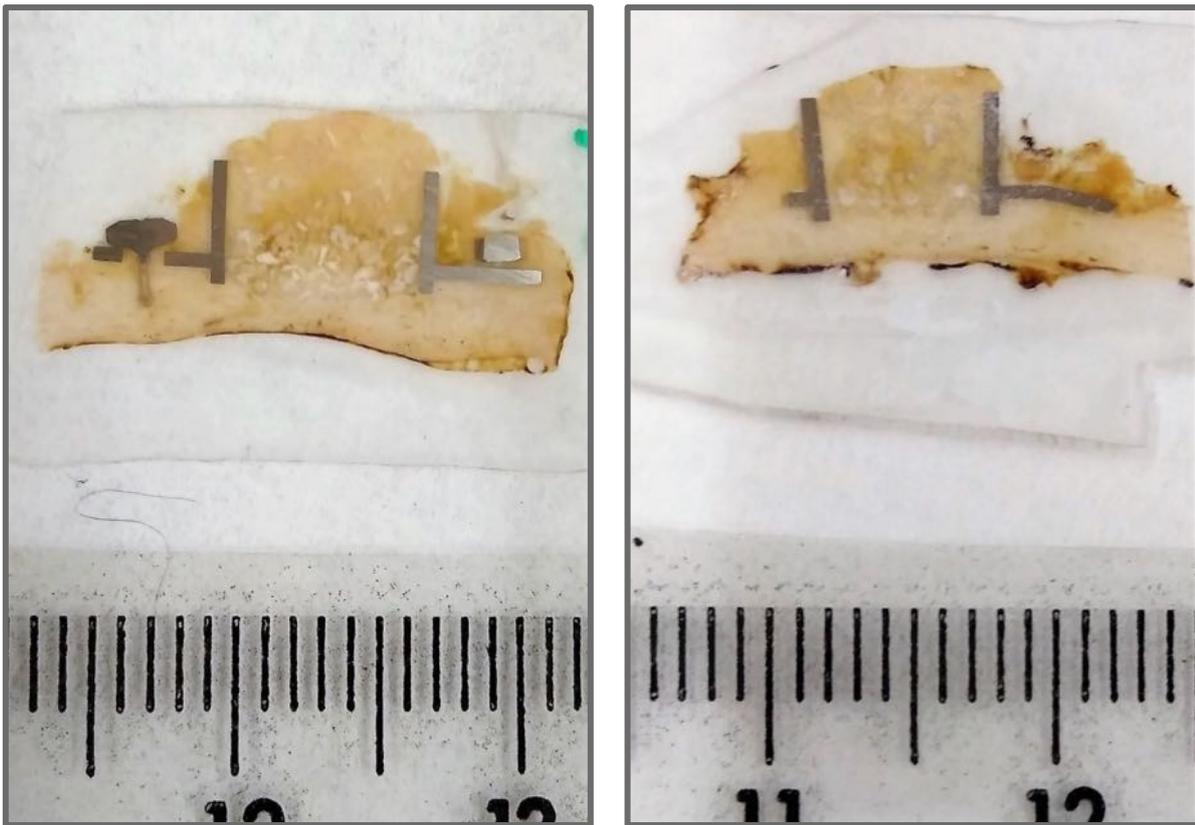
Fig. 64: Gráficas de los resultados de las muestras escaneadas antes y después de realizar tres compresiones a: A) 82 gf (0,7 Kg/cm<sup>2</sup>) y a B) 186 gf (1,6 Kg/cm<sup>2</sup>). Se observa como aumenta el porcentaje de muestra ocupada por partículas (% Obj. V/TV) y disminuye tanto el volumen (Vol. Poro) como el porcentaje de poro (% Poro) tras la compresión. Estas diferencias son mayores cuando se aplican 1,6 Kg/cm<sup>2</sup> de presión.

En resumen, los resultados del efecto de la presión de compactación evaluados mediante Micro-CT muestran que:

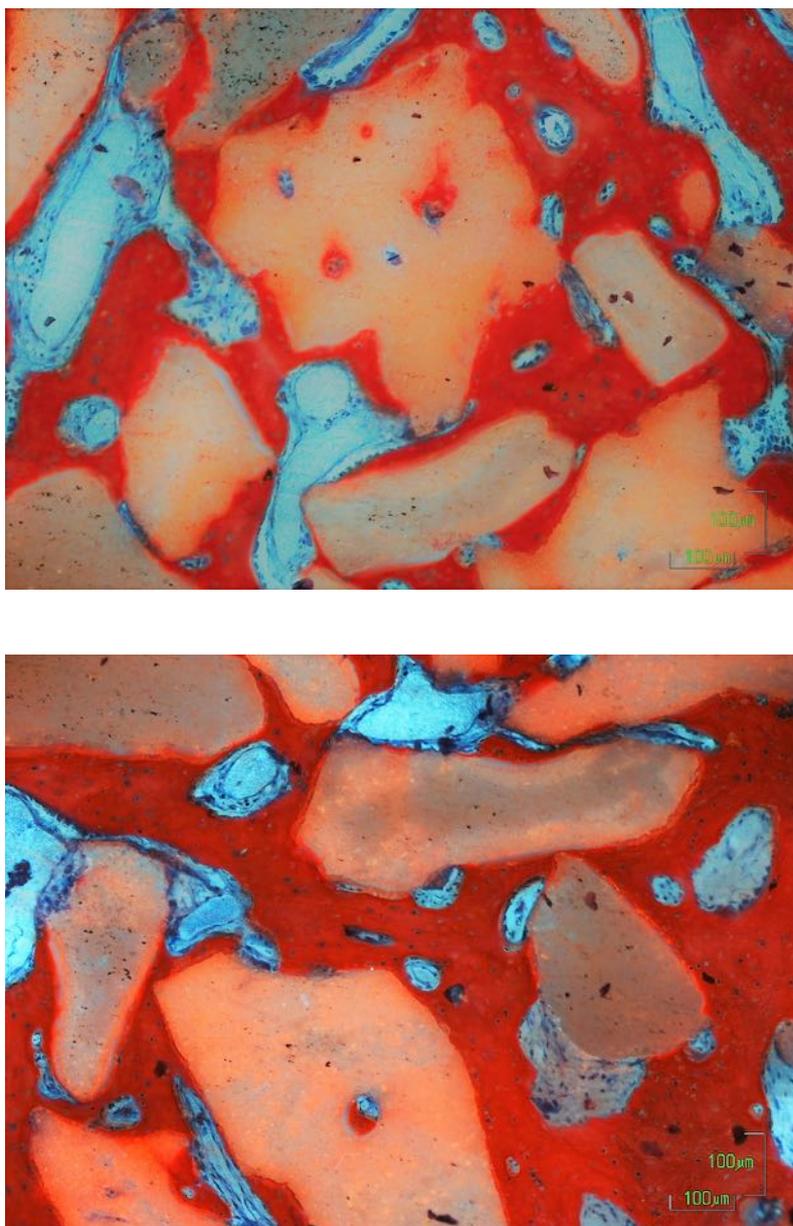
1. El volumen total de las muestras se reduce con la compresión.
2. El volumen y porcentaje de poro (espacios vacíos) se reduce levemente con la compresión. Influye tanto la fuerza como el número de compresiones.
3. Los espacios libres (volumen y porcentaje de poro) son mayores en el injerto de partícula de tamaño grande tanto inicialmente como con las diferentes compresiones.
4. El volumen inicial de cada muestra es diferente.
5. El porcentaje de la muestra ocupada por partículas aumenta con la compresión.
6. El número de partículas aumenta con la compresión lo que significa que hay fractura de algunas de las partículas.

#### 4.5. ESTUDIO PILOTO SOBRE UN ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.

El objetivo de este estudio piloto fue el de valorar la viabilidad de la técnica del diseño experimental y la posibilidad de cuantificar y comparar las variables dependientes a estudio (Fig. 65 y 66).



*Fig. 65: Imagen de los cortes histológicos previos a la tinción. En el lado izquierdo la muestra donde se realizaron 186 gf y en el lado derecho donde se realizaron 82 gf.*



*Fig. 66: Imágenes observadas al microscopio de las muestras histológicas. Se observó que la tinción era adecuada para observar las variables que queríamos analizar. Los resultados que queríamos obtener eran cuantificables con la metodología utilizada.*

Se observó una adecuada cicatrización postquirúrgica, los resultados del estudio piloto se describen en la Tabla 13.

ESTUDIO PILOTO	Izquierda (186 gf) 1,6 Kg/cm <sup>2</sup>	Derecha (82 gf) 0,7 Kg/cm <sup>2</sup>
NBF ROI1 (%)	40,59	43,70
NBF ROI2 (%)	24,62	15,45
BBC ROI1 (%)	89,13	88,75
BBC ROI2 (%)	48,11	29,60
BV	7	4
BVA (mm <sup>2</sup> )	3,87	4,34

*Tabla 13: Resultados del estudio piloto en cuanto a neoformación ósea, integración del material injertado y vascularización. NBF: porcentaje de tejido óseo mineralizado neoformado con respecto al área total de cada región de interés; BBC: porcentaje de contacto entre el nuevo hueso formado y las partículas de biomaterial; BV: número de vasos sanguíneos; BVA: área de los vasos sanguíneos.*

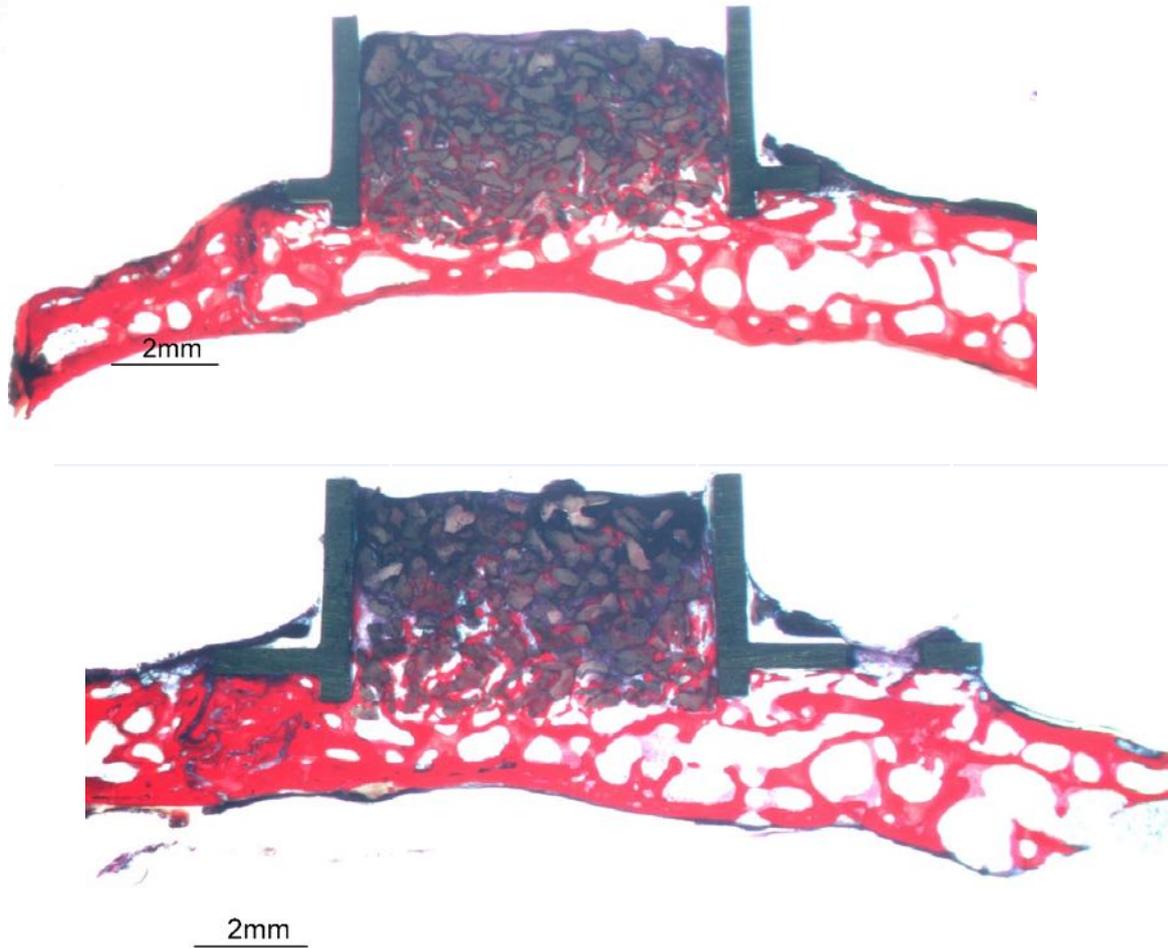
## **4.6. ESTUDIO PRINCIPAL SOBRE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

### **4.6.1. Resultados sobre el procedimiento quirúrgico**

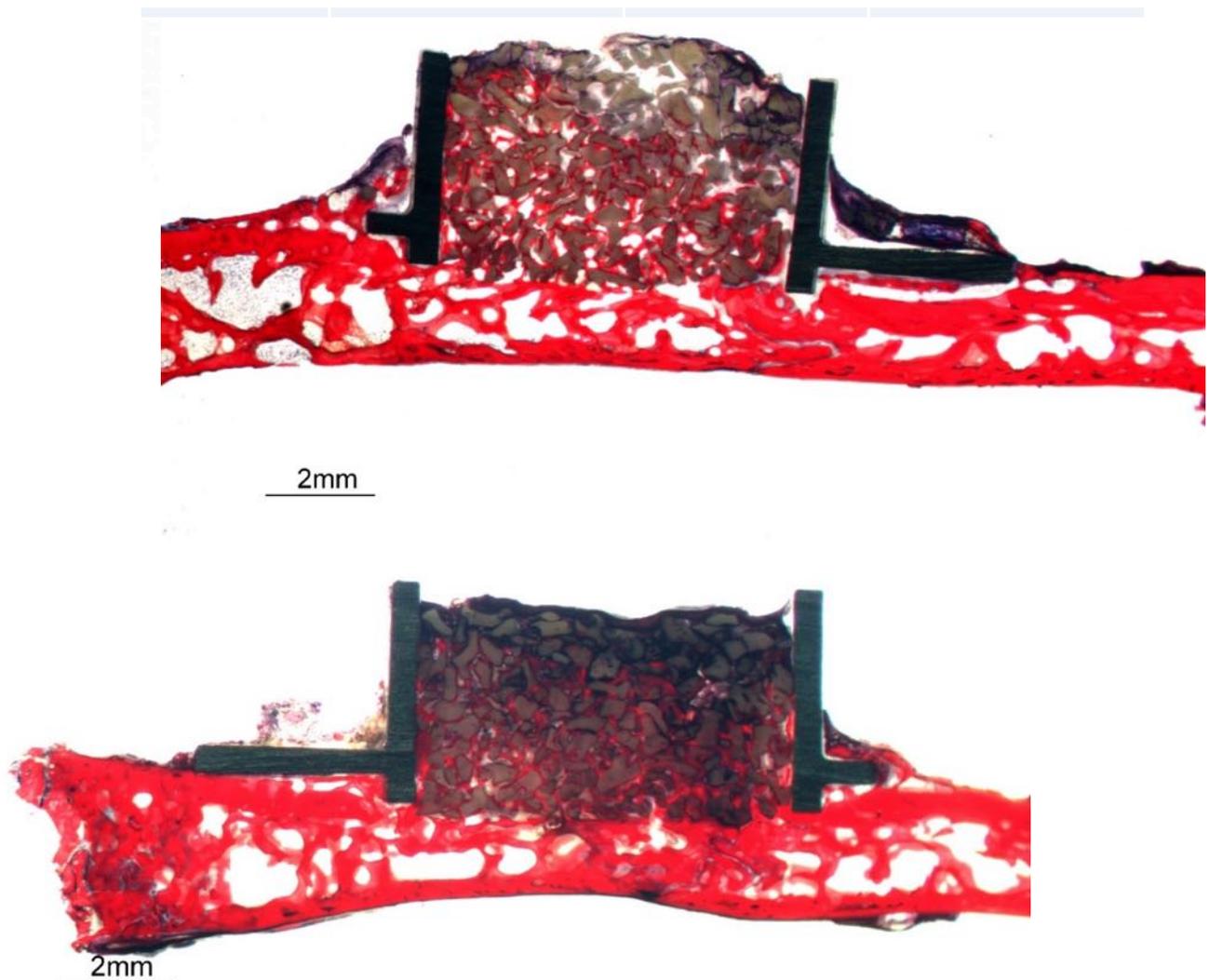
No hubo complicaciones quirúrgicas durante la colocación de los cilindros. Todos los animales tuvieron una buena cicatrización, sin observarse signos de dolor, fiebre o infección. En el momento de la eutanasia, las observaciones clínicas de las muestras seccionadas fueron normales y no se observaron signos de inflamación, necrosis tisular o infección.

### **4.6.2. Resultados sobre el análisis histológico**

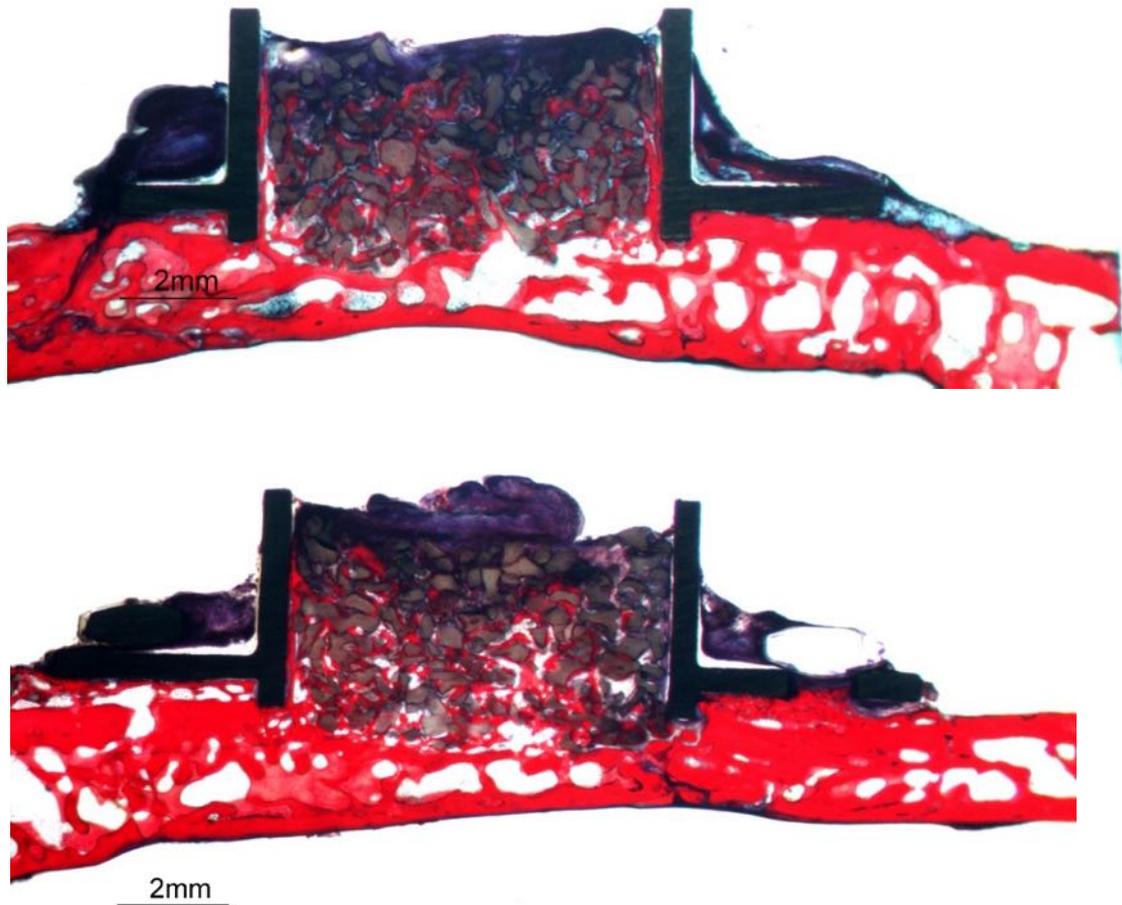
Tras el análisis histológico inicial se observó que todos los cilindros estaban intactos y bien fijados en su posición original (Fig. 67-70). En todos los cilindros se pudo apreciar regeneración ósea en distinto grado y todos los especímenes mostraron integración del injerto óseo con el nuevo hueso formado desde el hueso parietal nativo, además se observó formación ósea directamente sobre la superficie del material (Fig. 74-79). Los resultados del estudio se muestran en las Tablas 14 y 15.



*Fig. 67: Imágenes histológicas del animal número 2 tomadas con microscopía óptica que muestran tras 6 semanas de curación los cilindros de titanio con los rellenos de xenoinjerto sometido a las diferentes fuerzas evaluadas. El defecto superior corresponde a la zona donde se probó la mayor fuerza de compresión del biomaterial (186 gf - 1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) y el inferior corresponde al defecto donde se realizó una menor fuerza de compresión (82 gf - 0,7 Kg/cm<sup>2</sup>). En los cortes se observan los cilindros perfectamente adaptados y fijados en su posición original. Tinción: Azul de Stevenel.*



*Fig. 68: Imágenes histológicas del animal número 6 tomadas con microscopía óptica que muestran tras 6 semanas de curación los cilindros de titanio con los rellenos de xenoinjerto sometido a las diferentes fuerzas evaluadas. El defecto superior corresponde a la zona donde se probó la mayor fuerza de compresión del biomaterial (186 gf - 1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) y el inferior corresponde al defecto donde se realizó una menor fuerza de compresión (82 gf - 0,7 Kg/cm<sup>2</sup>). En los cortes se observan los cilindros perfectamente adaptados y fijados en su posición original. Tinción: Azul de Stevenel.*



*Fig. 69: Imágenes histológicas del animal número 7 tomadas con microscopía óptica que muestran tras 6 semanas de curación los cilindros de titanio con los rellenos de xenoinjerto sometido a las diferentes fuerzas evaluadas. El defecto superior corresponde a la zona donde se probó la mayor fuerza de compresión del biomaterial (186 gf - 1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) y el inferior corresponde al defecto donde se realizó una menor fuerza de compresión (82 gf - 0,7 Kg/cm<sup>2</sup>). En los cortes se observan los cilindros perfectamente adaptados y fijados en su posición original. Tinción: Azul de Stevenel.*



Fig. 70: Imágenes histológicas del animal número 8 tomadas con microscopía óptica que muestran tras 6 semanas de curación los cilindros de titanio con los rellenos de xenoinjerto sometido a las diferentes fuerzas evaluadas. El defecto superior corresponde a la zona donde se probó la mayor fuerza de compresión del biomaterial (186 gf - 1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) y el inferior corresponde al defecto donde se realizó una menor fuerza de compresión (82 gf - 0,7 Kg/cm<sup>2</sup>). En los cortes se observan los cilindros perfectamente adaptados y fijados en su posición original. Tinción: Azul de Stevenel.

	Compresión	1		2		3		4		5		6		7		8	
		ROI1	ROI2	ROI1	ROI2	ROI1	ROI2	ROI1	ROI2	ROI1	ROI2	ROI1	ROI2	ROI1	ROI2	ROI1	ROI2
NBF (%)	0,7 Kg/cm <sup>2</sup>	16,21	1,1	26,25	2,24	41,5	1,69	29,55	16,08	18,71	3,37	36,27	5,15	36,12	8,21	27,34	1,1
	1,6 Kg/cm <sup>2</sup>	14,01	0,51	39,52	3,04	22,06	3,71	27,28	5,9	22,94	1,3	30,44	9,35	27,86	7,2	36,84	14,81
BBC (%)	0,7 Kg/cm <sup>2</sup>	31,15	0	41,42	20,5	83,61	10,22	83,95	63,48	26,23	0	83,87	27,07	71,16	19,05	44,3	5,71
	1,6 Kg/cm <sup>2</sup>	49,52	0	88,05	18,87	82,91	10,41	87,8	39,23	23,69	0	86,78	34,35	66,79	20,68	69,07	37,47
BV	0,7 Kg/cm <sup>2</sup>	12		1		3		4		2		2		8		3	
	1,6 Kg/cm <sup>2</sup>	7		2		1		3		3		6		2		1	
BVA (mm <sup>2</sup> )	0,7 Kg/cm <sup>2</sup>	1,85 (1,26)		0,27		0,99 (0,68)		2,03 (1,00)		1,39 (0,40)		0,98 (0,55)		0,42 (0,23)		0,90 (0,92)	
	1,6 Kg/cm <sup>2</sup>	0,86 (0,75)		1,46 (1,61)		0,96		0,65 (0,06)		1,05 (0,59)		0,90 (0,18)		0,41 (0,13)		0,37	

Tabla 14: Resultados del estudio. Datos de las mediciones (desviación estándar) de los 8 conejos. NBF: porcentaje de nuevo tejido óseo mineralizado formado con respecto al área total de cada región de interés; BBC: porcentaje de contacto entre el nuevo hueso formado y las partículas de biomaterial; BV: número de vasos sanguíneos; BVA: área de los vasos sanguíneos.

#### 4.6.2.1. Neoformación ósea.

En cuanto a la **neoformación ósea** indicada como el porcentaje de tejido óseo mineralizado neoformado con respecto al área total de cada región de interés (NBF), los resultados mostraron (Fig. 71):

- En la región de interés 1 (ROI1) cerca de la calota, se observó una formación ósea del  $29,0 \pm 8,8\%$  con una fuerza de compresión de 82 gf y del  $27,6 \pm 8,2\%$  con una fuerza de compresión de 186 gf. La diferencia entre ambas fuerzas de compresión no resultó ser estadísticamente significativa ( $p=0,844$ ).
- En la región de interés 2 (ROI2) cerca de la membrana de colágeno, se observó una formación ósea del  $4,9 \pm 5,1\%$  con la fuerza de compresión menor y del  $5,7 \pm 4,7\%$  con la fuerza de compresión mayor. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las dos fuerzas de compresión aplicadas ( $p=0,844$ ).
- La región ROI1 presentaba mayores valores de neoformación ósea que la ROI2, resultando en diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,008$ ).

El hueso regenerado presentaba un aspecto trabeculado mineralizado maduro (se apreciaba una coloración roja característica de este tipo de tinción). En algunas de las superficies trabeculares óseas se apreciaron ribetes de osteoide recubriendo la superficie ósea siendo esto un índice de síntesis ósea activa. Fueron mucho más evidentes los ribetes de osteoide en asociación a las hileras de OBs en comparación con la presencia de OCs, que se detectaron de forma más aislada. (Fig. 74-79)

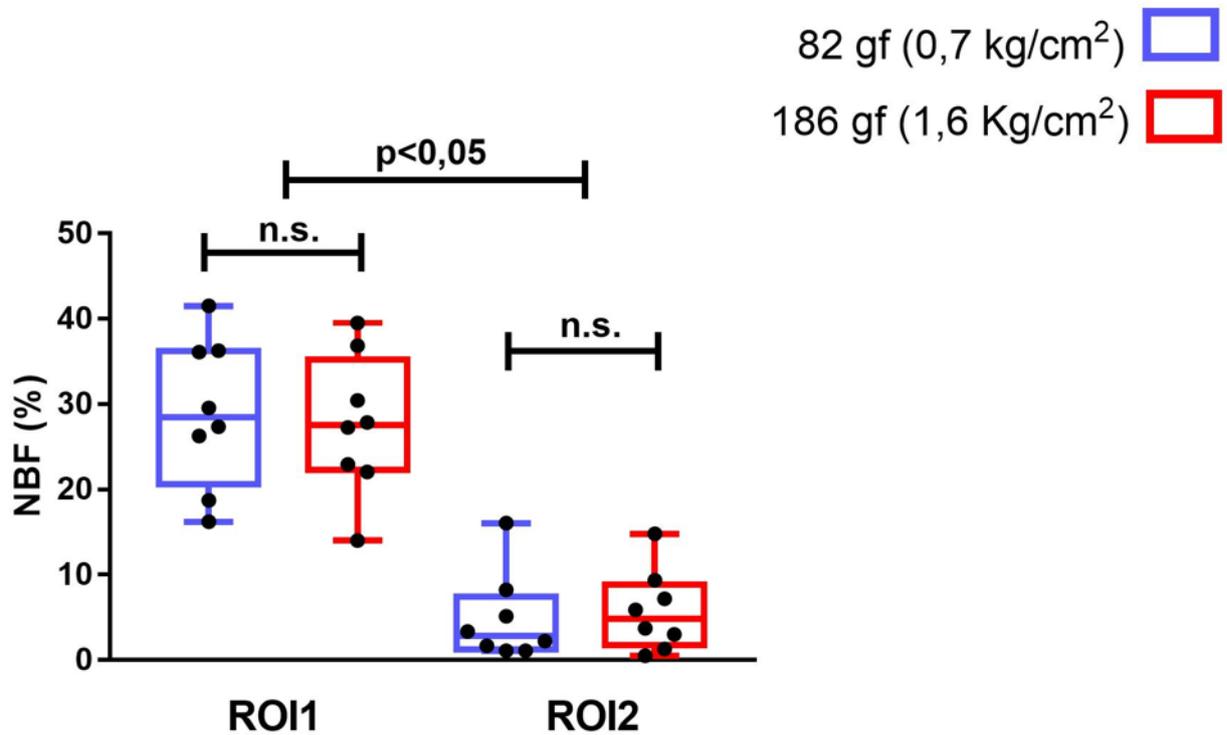


Fig. 71: Medidas histomorfométricas del porcentaje de tejido óseo mineralizado neoformado con respecto al área total de cada región de interés (NBF) tras 6 semanas de curación, representadas en diagramas de cajas. Los puntos muestran los datos de todos los especímenes. Se pueden observar la mediana, percentiles, valor máximo y mínimo de cada grupo y los valores atípicos. ns: no significativo.

#### 4.6.2.2. Integración del biomaterial.

Se investigó la integración del xenoinjerto particulado midiendo el **contacto hueso-biomaterial (BBC)** calculado mediante el porcentaje de contacto entre el nuevo hueso formado y las partículas de biomaterial, los resultados se presentan en la Fig. 72.

- En ROI1, se observó un contacto medio del  $58,2 \pm 25,0\%$  cuando se realizó la fuerza de compresión menor y del  $69,3 \pm 22,9\%$  con la fuerza de compresión mayor. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en función de las dos fuerzas de compresión aplicadas ( $p=0,195$ ).
- En ROI2, se observó un contacto medio del  $18,3 \pm 20,8\%$  cuando se realizó una fuerza de compresión menor y del  $20,1 \pm 15,9\%$  con una fuerza de compresión mayor. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos fuerzas de compresión aplicadas ( $p=0,625$ ).
- Los valores de BBC fueron mayores en ROI1 que en ROI2 siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,008$ ).

El biomaterial se pudo observar completamente osteointegrado (Fig. 74-77), rodeado por hueso maduro con presencia de osteocitos maduros. En las zonas donde apareció parcialmente osteointegrado, la superficie no osteointegrada presentaba colonización celular, que en algunos casos correspondía a células multinucleadas. No se aprecia formación fibrosa de transición entre el hueso regenerado y el material, dándose una buena osteointegración.

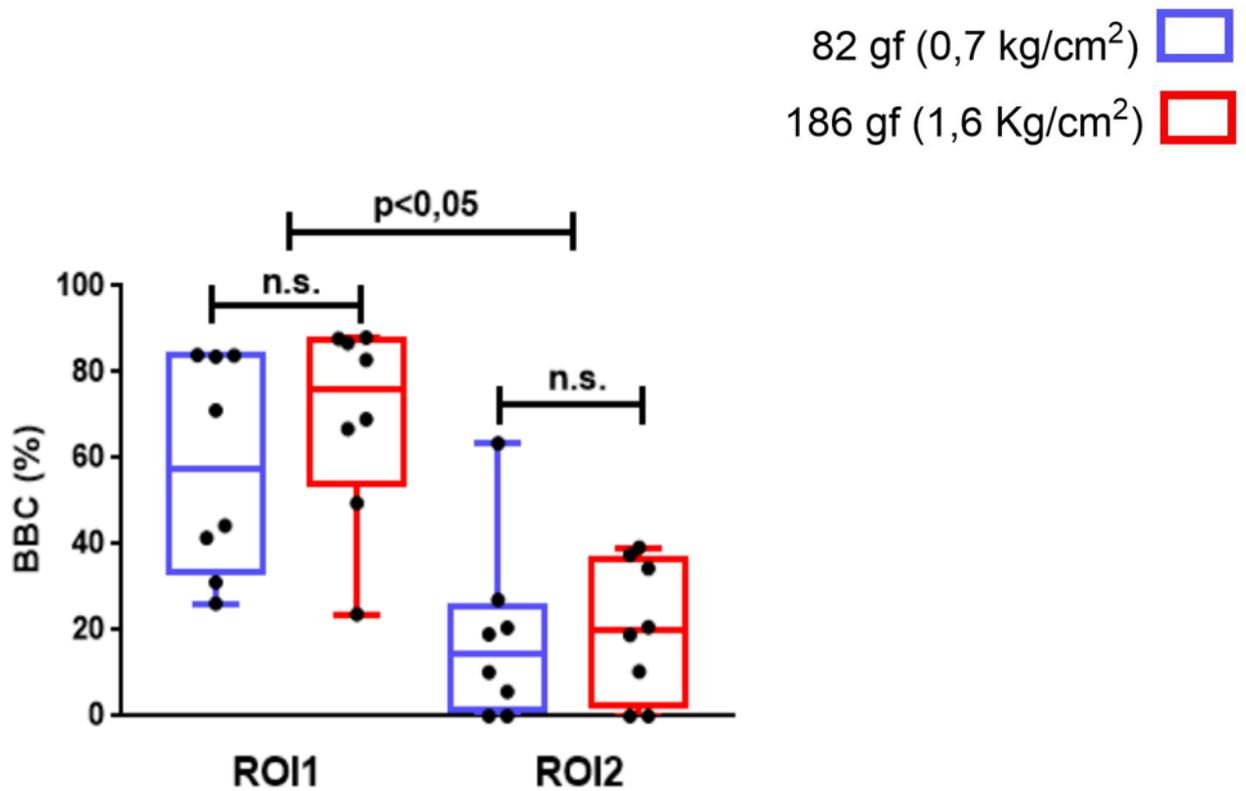


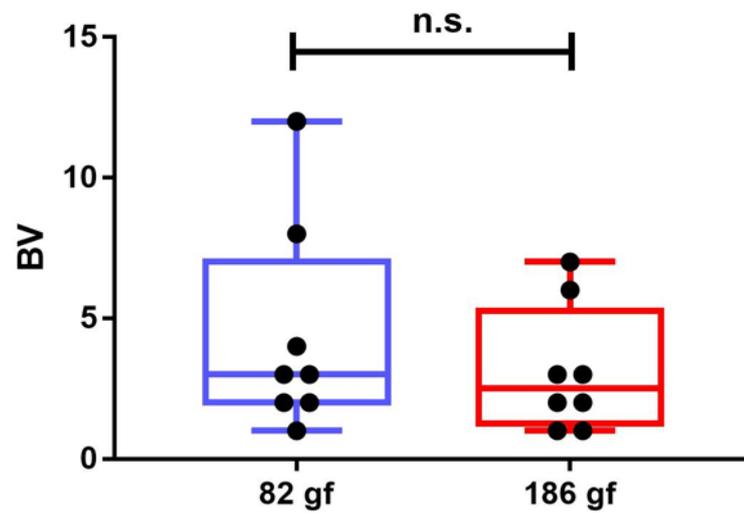
Fig. 72: Medidas histomorfométricas del porcentaje de contacto hueso-biomaterial (BBC) tras 6 semanas de curación representadas en diagramas de cajas. Los puntos muestran los datos de todos los especímenes. Se pueden observar la mediana, percentiles, valor máximo y mínimo de cada grupo y los valores atípicos. ns: no significativo.

#### 4.6.2.3. Vascularización.

Respecto a la **vascularización** se midió de dos formas, haciendo un recuento de los vasos y midiendo el área de los mismos. Los resultados obtenidos mostraron (Fig. 73):

- En general, la vascularización fue escasa (Fig. 74-76). En ROI1 se observó un número de vasos de  $4,4 \pm 3,7$  en los defectos donde se realizó una menor fuerza de compresión y de  $3,1 \pm 2,2$  en los que se realizó mayor fuerza de compresión, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,297$ ). Se consideraron los vasos sanguíneos presentes en la médula ósea originados de la vascularización propia de la médula y los vasos que conformaron osteonas (signos de hueso maduro) que se formaron a partir de vasos preexistentes. En la zona más superficial (ROI2) apareció más tejido conectivo con mayor formación de vasos irregulares, sinuosos u oblicuos.
- El área media de los vasos sanguíneos (BVA) fue de  $1,1 \pm 0,6 \text{ mm}^2$  en las muestras donde se realizó una menor fuerza de compresión y de  $0,8 \pm 0,4 \text{ mm}^2$  en las muestras donde se aplicó una fuerza de compresión mayor. Aun siendo menor el área de los vasos en las muestras con la aplicación de una mayor fuerza de compresión, la diferencia tampoco resultó ser estadísticamente significativa ( $p=0,148$ ).

A)



B)

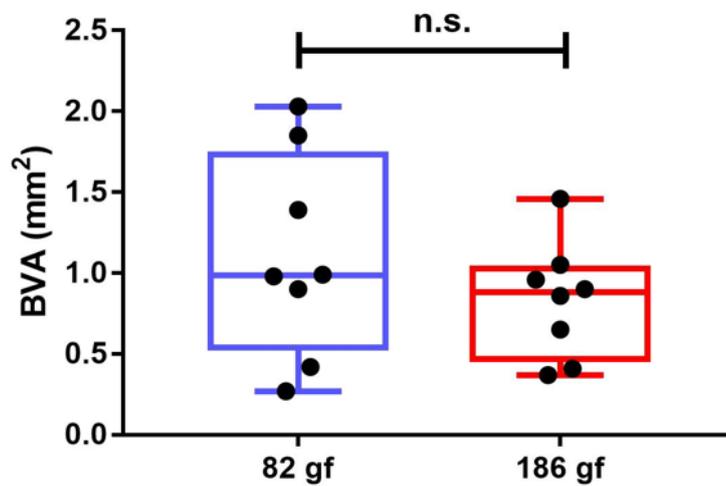


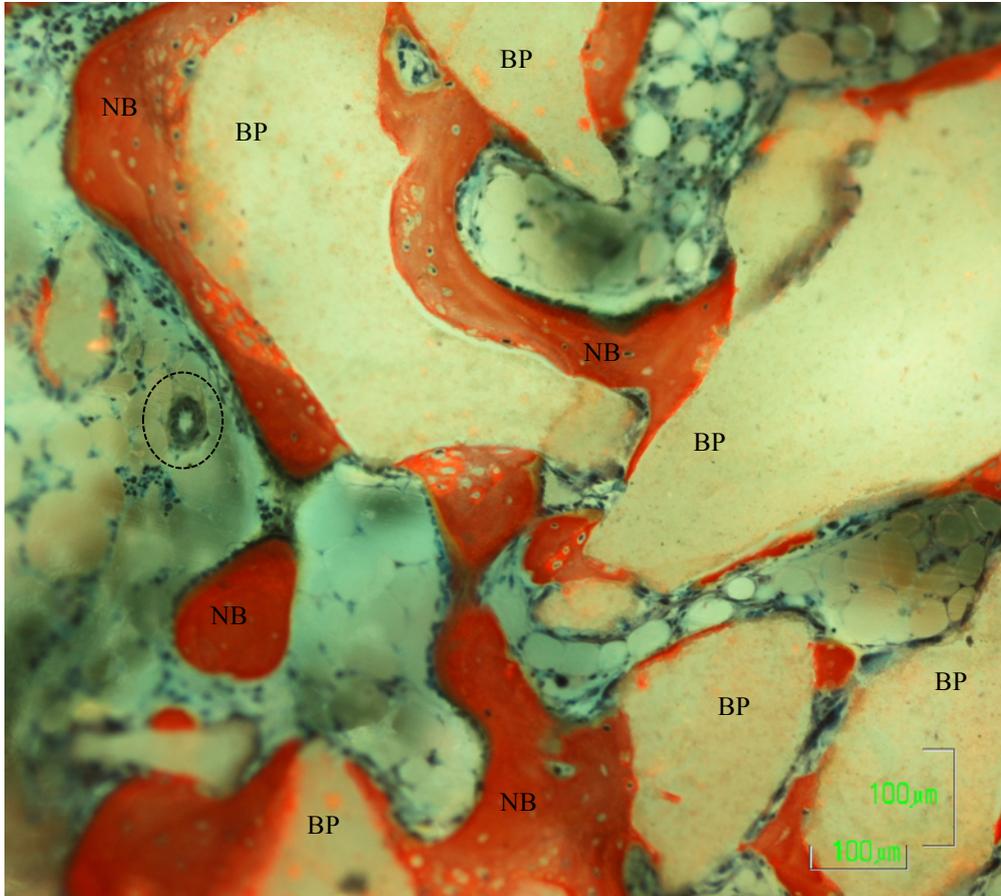
Fig. 73: Medidas histomorfométricas de la vascularización tras 6 semanas de curación representadas en diagramas de cajas. A) Número de vasos sanguíneos (BV); B) Área de los vasos sanguíneos (BVA). Los puntos muestran los datos de todos los especímenes. Se pueden observar la mediana, percentiles, valor máximo y mínimo de cada grupo y los valores atípicos. ns: no significativo.

La Tabla 15 recoge los resultados medios del estudio in vivo.

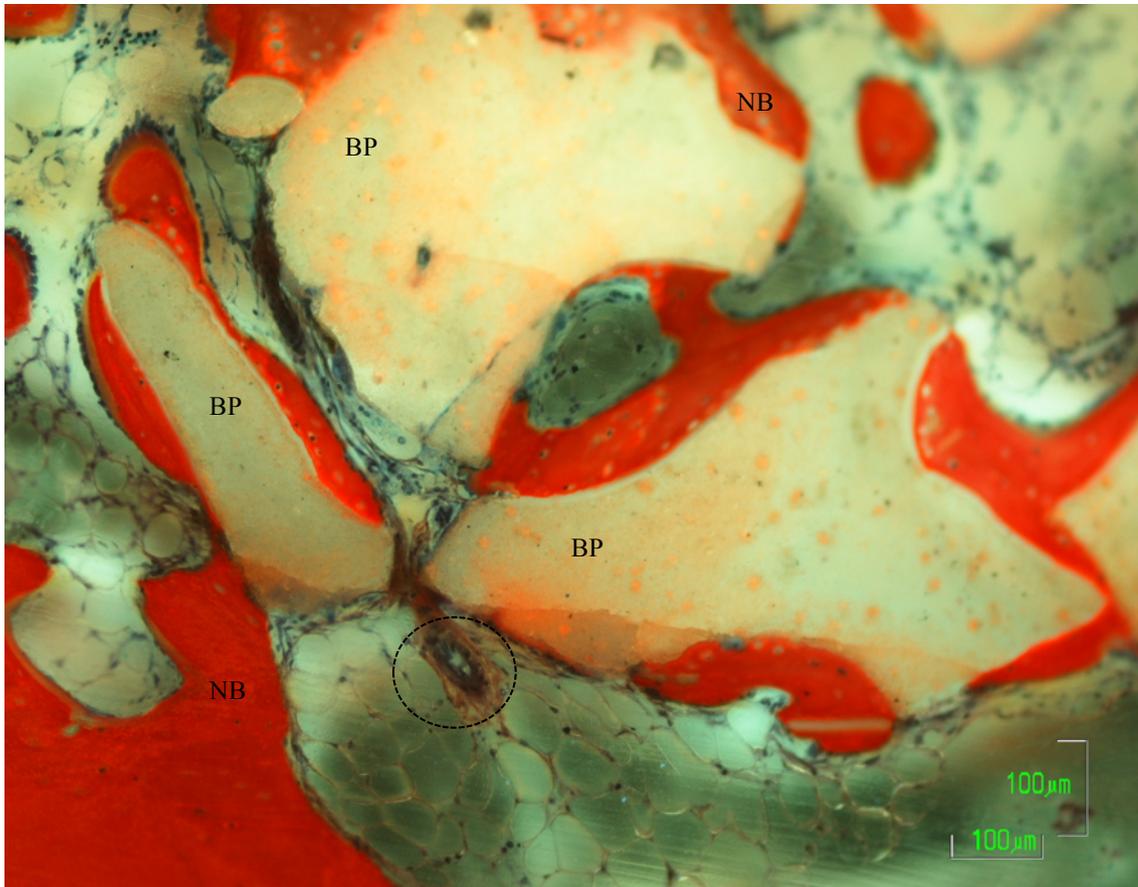
	82 gf = 0,7 Kg/cm <sup>2</sup>		186 gf = 1,6 Kg/cm <sup>2</sup>	
	ROI1	ROI2	ROI1	ROI2
NBF (%)	28.99 ± 8.78 [28.45]	4.87 ± 5.14 [2.81]	27.62 ± 8.22 [27.57]	5.73 ± 4.72 [4.81]
BBC (%)	58.21 ± 24.97 [57.73]	18.25 ± 20.76 [14.64]	69.33 ± 22.87 [75.99]	20.13 ± 15.92 [19.78]
BV	4.38 ± 3.74 [3.00]		3.13 ± 2.23 [2.50]	
BVA (mm <sup>2</sup> )	1.10 ± 0.62 [0.99]		0.83 ± 0.36 [0.88]	

*Tabla 15: Resultados medios obtenidos en función de las diferentes fuerzas de compresión aplicadas en cuanto a porcentaje de tejido óseo mineralizado neoformado (NBF), a porcentaje de contacto de nuevo hueso con el biomaterial (BBC); al número de vasos sanguíneos (BV) y al área de los vasos sanguíneos (BVA). Medias ± desviación estándar. [Mediana].*

Las imágenes 74 a 79, presentan las histologías de algunas de las muestras a estudio con detalles importantes de las variables dependientes analizadas.



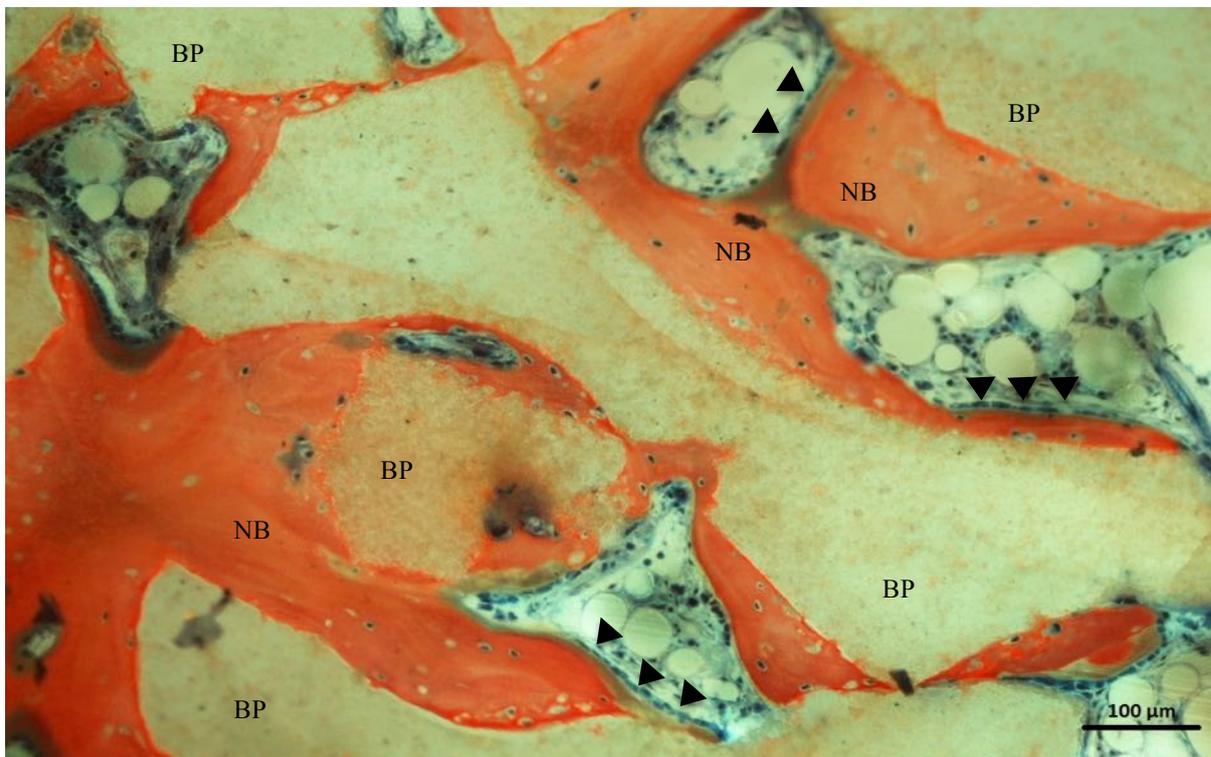
*Fig. 74: Sección histológica del cilindro con xenoinjerto particulado tras 6 semanas de curación a mayor magnificación. Imagen del biomaterial compactado a 186 gf (1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) en el conejo número 4. Se observa contacto directo del nuevo hueso (NB) con las partículas de biomaterial (BP), mostrando una adecuada integración del mismo. Se pueden observar osteocitos maduros embebidos en el nuevo hueso formado. El círculo resalta un vaso sanguíneo. Tinción: Azul de Stevenel en la que el hueso mineralizado aparece teñido de color rojo.*



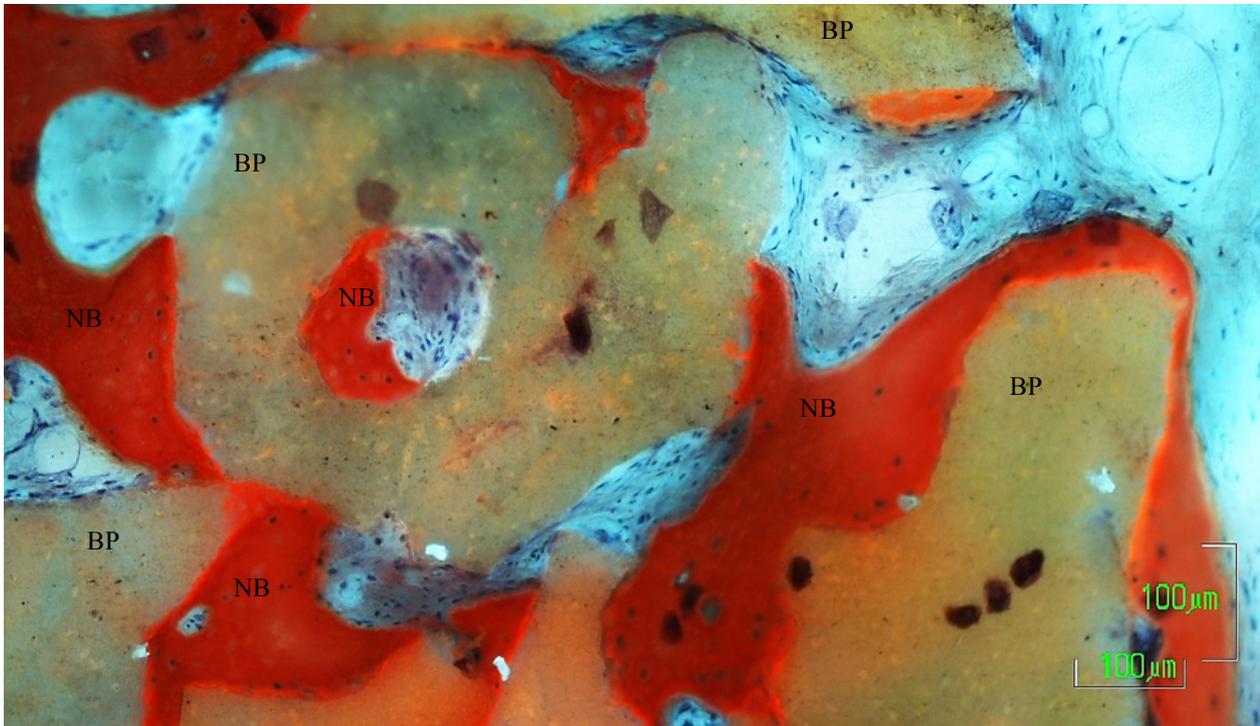
*Fig. 75: Sección histológica del cilindro con xenoinjerto particulado tras 6 semanas de curación a mayor magnificación. Imagen del biomaterial compactado a 186 gf (1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) en el conejo número 4. Se observa contacto directo del nuevo hueso (NB) con las partículas de biomaterial (BP), mostrando una adecuada integración del mismo. Se pueden observar osteocitos maduros embebidos en el nuevo hueso formado. El círculo resalta un vaso sanguíneo. Tinción: Azul de Stevenel en la que el hueso mineralizado aparece teñido de color rojo.*



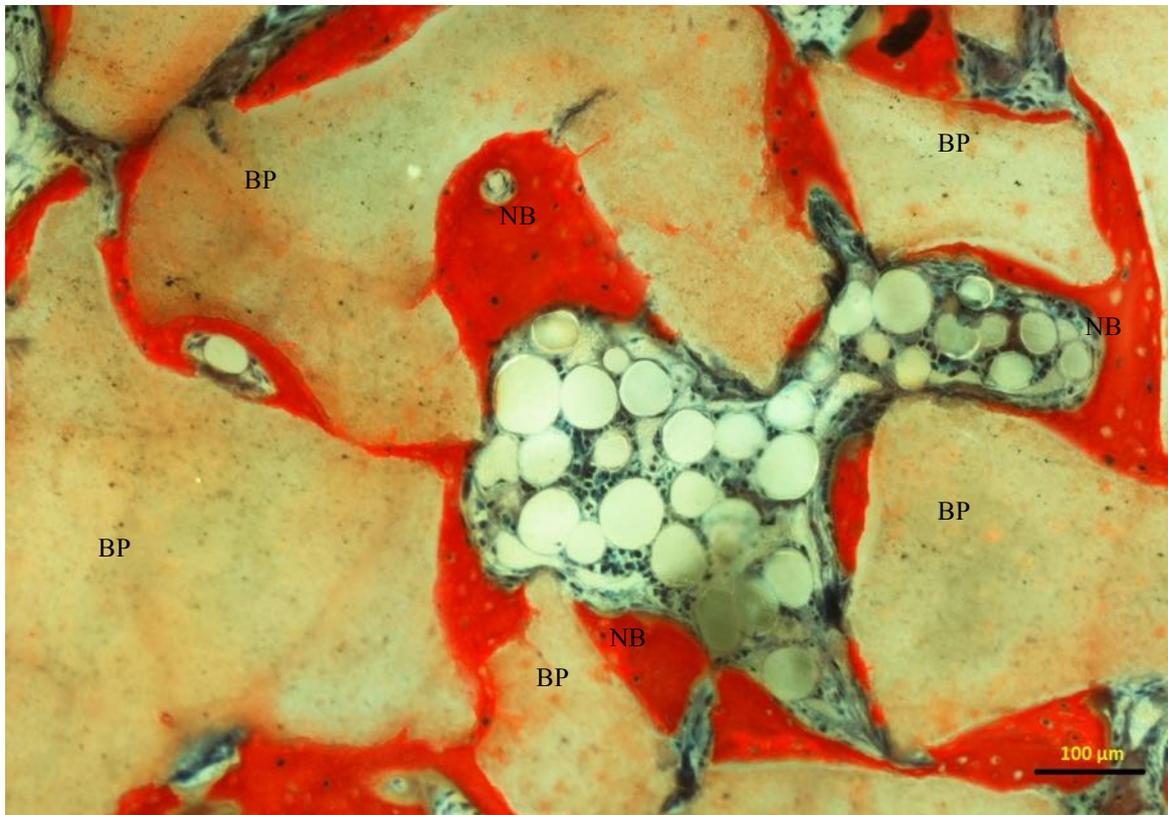
Fig. 76: Sección histológica del cilindro con xenoinjerto particulado tras 6 semanas de curación a mayor magnificación. Imagen del biomaterial compactado a 82 gf ( $0,7 \text{ Kg/cm}^2$ ) en el conejo número 1. Se observa contacto directo del nuevo hueso (NB) con las partículas de biomaterial (BP), mostrando una adecuada integración del mismo. Se pueden observar osteocitos maduros embebidos en el nuevo hueso formado. Esta presente matriz osteoide en la superficie ósea (color marrón) asociada a líneas de OBs (flechas negras). El círculo resalta un vaso sanguíneo. Tinción: Azul de Stevenel en la que el hueso mineralizado aparece teñido de color rojo.



*Fig. 77: Sección histológica del cilindro con xenoinjerto particulado tras 6 semanas de curación a mayor magnificación. Imagen del biomaterial compactado a 186 gf (1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) en el conejo número 4. Se observa contacto directo del nuevo hueso (NB) con las partículas de biomaterial (BP), mostrando una adecuada integración del mismo. Se aprecia el proceso de neoformación ósea trabecular. Se pueden observar osteocitos maduros embebidos en el nuevo hueso formado. Esta presente matriz osteoide en la superficie ósea (color marrón) asociada a líneas de OBs (flechas negras). Se ha desarrollado medula ósea adiposa y hematopoyética. La medula ósea esta vascularizada. Tinción: Azul de Stevenel en la que el hueso mineralizado aparece teñido de color rojo.*



*Fig. 78: Sección histológica del cilindro con xenoinjerto particulado tras 6 semanas de curación a mayor magnificación. Imagen del biomaterial compactado a 186 gf (1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) en el conejo número 6. Se observa contacto directo del nuevo hueso (NB) con las partículas de biomaterial (BP), mostrando una adecuada integración del mismo. Se pueden observar osteocitos maduros embebidos en el nuevo hueso formado. Tinción: Azul de Stevenel en la que el hueso mineralizado aparece teñido de color rojo.*



*Fig. 79: Sección histológica del cilindro con xenoinjerto particulado tras 6 semanas de curación a mayor magnificación. Imagen del biomaterial compactado a 186 gf (1,6 Kg/cm<sup>2</sup>) en el conejo número 4. Se observa contacto directo del nuevo hueso (NB) con las partículas de biomaterial (BP), mostrando una adecuada integración del mismo. Tinción: Azul de Stevenel en la que el hueso mineralizado aparece teñido de color rojo.*



## **5. DISCUSIÓN**



Este trabajo experimental en modelo animal, ha tenido como objetivo evaluar el efecto que puede producir el empleo de diferentes fuerzas de compresión sobre un injerto óseo particulado durante su manejo quirúrgico para su colocación en el defecto, en lo que respecta a los resultados de neoformación ósea y vascularización.

La regeneración ósea con un andamiaje ó injerto óseo in vivo involucra el reclutamiento y penetración de células desde los tejidos circundantes así como de la vascularización (176). Los espacios resultantes intergránulo que se forman con el material de relleno particulado afectan a la osteoconductividad y biodegradación de los materiales (194).

A pesar del amplio aumento de procedimientos con materiales de injerto para regeneración ósea (143,250) y de la amplia variedad de injertos óseos disponibles, que han ido emergiendo con diferentes propiedades y características, hay varios aspectos que aún hoy en día desconocemos; entre ellos, la influencia de la fuerza de compresión sobre el injerto óseo particulado cuando es colocado en la zona a regenerar. En general, hay recomendaciones clínicas contradictorias sin excesiva base científica (34), en las que se prevé que una elevada fuerza de condensación podría provocar una fractura de las partículas y una reducción en los espacios por donde deberán penetrar vasos y células (22,29–31) y otras que consideran que una condensación muy suave resultará en una menor área de biomaterial para la aposición celular y un mayor espacio entre las partículas que podría conllevar a micromovimientos dentro del injerto lo que dificultaría una correcta formación ósea (32,33).

Efectivamente, a la vista de la literatura científica disponible al respecto, se puede aceptar que la microestructura (tamaño de cristal, poro, tamaño de partícula, espacio interparticular, área de superficie,..) de los materiales de sustitución ósea pueden tener un impacto en la respuesta biológica del hueso (34,166,173,194,251).

Además, los injertos óseos utilizados durante la ROG deben cumplir varios requisitos. Por un lado, deben sostener adecuadamente la membrana para mantener un volumen predefinido que pueda ser ocupado posteriormente por el hueso regenerado. Por otro, deben servir como una estructura guía en la cual el hueso pueda crecer o incluso ser estimulado para que crezca (22). Una mayor porosidad (inter e intrapartícula) resulta en un mayor y más rápido crecimiento y reemplazo de hueso al permitir una adecuada infiltración celular y de vasos sanguíneos dentro del material (145,166). A mayor interconectividad de poro mejor interconexión entre los poros, lo que es importante para la angiogénesis y osteogénesis dentro de los biomateriales debido a la mejora del flujo de sangre y de fluido intersticial, lo que favorece el transporte de oxígeno y de

nutrientes (145,252). En este sentido, diversos estudios han mostrado que las células no pueden penetrar poros estrechos y poco interconectados disminuyendo en esos casos el crecimiento óseo (189,190,253).

Fundamentalmente por las circunstancias anteriormente descritas, diversos autores abogan por no comprimir en exceso estos materiales para no obstaculizar la revascularización del material a causa de una reducción del espacio interparticular (22,29–31).

Resultaba previsible que la reorganización de las partículas, y por tanto la geometría final del injerto particulado, podría variar con las diferentes fuerzas de compresión aplicadas durante el procedimiento quirúrgico. Se ha podido comprobar, tras las pruebas previas al diseño final del estudio realizadas mediante mediciones con microtomografía computerizada de alta resolución, que la porosidad del material (poros y espacios interparticulares) disminuía con el aumento de la compresión. Esta constatación justificaba el desarrollo de nuestro estudio experimental in vivo, empleando un modelo de regeneración ósea vertical en calota de conejo.

## 5.1. DISCUSIÓN SOBRE LA METODOLOGÍA EMPLEADA.

### 5.1.1. Sobre la idoneidad y diseño del modelo experimental

En el presente trabajo se han utilizado 8 conejos New Zealand de aproximadamente 6 kg de peso, para probar dos fuerzas diferentes de compresión de un material de injerto óseo particulado durante los procedimientos de regeneración ósea.

La experimentación animal es fundamental en las pruebas de materiales de sustitución ósea a efectos de poder valorar la relación de diversos factores con los resultados a nivel estructural y/o molecular, en los procesos de regeneración ósea. Aunque los modelos animales pueden representar de cerca la situación clínica humana, se debe recordar que es sólo una aproximación y que cada modelo animal tiene ventajas y desventajas características (254). La extrapolación de los resultados al entorno clínico en ocasiones no es posible y los resultados deben de ser interpretados con precaución (255). En cualquier caso, se requieren pruebas de diferentes técnicas y/o materiales de implantación en modelos de experimentación previo a su introducción en la práctica clínica general.

Los factores determinantes en la elección del modelo animal a utilizar deben incluir: los costos de la adquisición y cuidado de los animales, la disponibilidad, la aceptación por la sociedad, la tolerancia para el cautiverio, el bajo nivel de atenciones en el mantenimiento, el fácil manejo, la resistencia a la infección o a la enfermedad, la uniformidad inter-animal, la presencia de características biológicas análogas a los humanos, la tolerancia a la cirugía, la existencia de una base de datos con información biológica de esa especie, la vida útil de las especies elegidas debe ser adecuada para la duración del estudio y además, el tamaño del animal debe ser adecuado para el número y tamaño de los especímenes a probar. (254,256,257)

Se han desarrollado varios modelos de experimentación con animales para contar con condiciones mecánicas y fisiológicas similares a las humanas y probar y comparar diferentes biomateriales de sustitución ósea como rata/ratón, conejo, perro, oveja, cabra y cerdo (258). Los estándares internacionales establecieron que para probar materiales de implantación en hueso, los perros, ovejas, cabras, cerdos y conejos son modelos adecuados (257,259).

Debido a que ninguna especie presenta todos los requerimientos de un modelo animal ideal, un entendimiento de las diferencias en la arquitectura y remodelado óseo puede ayudar en la selección del modelo más útil para cada investigación (Tabla 16).

Aunque la rata es una de las especies más comúnmente usadas en la investigación médica y ha sido también empleada ampliamente en estudios preclínicos para probar biomateriales como sustitutos óseos (260–262), este modelo presenta unas limitaciones obvias (258). En comparación con otros animales más grandes, los roedores tienen huesos largos de pequeño tamaño y corticales delgadas y frágiles, además existen disimilitudes significativas entre el hueso de la rata y del humano (diferencias significativas en la composición, estructura, cicatrización y anatomía ósea) y las limitaciones del tamaño que hacen a las ratas inadecuadas para probar simultáneamente múltiples implantes de sustitutos óseos (254,258).

El perro es uno de los animales más frecuentemente usados en investigación dental y musculoesquelética (254,263). Diversos estudios han realizado pruebas de biomateriales óseos durante procesos de ROG en perros (264–268). Existe una literatura considerable comparando el hueso humano y el canino con respecto a la utilidad de este animal como animal de experimentación en ortopedia. Respecto a su tamaño, tanto el instrumental como los implantes de uso humano disponibles comercialmente, se pueden emplear en este modelo (254). En cuanto a la microestructura, mientras el hueso humano adulto tiene una estructura de osteonas secundarias, el hueso del perro tiene una microestructura mezcla de osteonas secundarias y hueso plexiforme (269). A pesar de la similitud en la composición ósea, el hueso del perro tiene significativamente mayor densidad mineral que el hueso humano, (269) puede soportar una mayor resistencia a la compresión antes de fallar (254,270) y posee una mayor tasa de remodelado (254).

Aunque la mayor parte de la literatura sostiene que el perro es el más adecuado como modelo de comparación con el hueso humano desde un punto de vista biológico (254), existen cada vez más problemas éticos relacionados con el uso de perros en la investigación médica debido a su condición de animales de compañía (254).

En cuanto a los cerdos se consideran los modelos que mejor representan los procesos de regeneración ósea humana debido a la similitud en la anatomía, morfología, capacidad de cicatrización, tasa de regeneración, remodelado y densidad mineral (258,271). Aunque el hueso porcino cuenta con una red trabecular más densa, la estructura ósea laminar es similar a la de los humanos (254,258). Estos animales han sido empleados para probar materiales de sustitución

ósea en diversos estudios (272–274). Las razas comerciales de cerdos generalmente se consideran no adecuadas para la investigación ortopédica debido a sus grandes tasas de crecimiento y su excesivo peso corporal final (254). El desarrollo de los “minipigs” ha superado este problema hasta cierto punto (254). Sin embargo, los cerdos son a menudo considerados difíciles de manipular, ruidosos y agresivos (254,258) y por lo tanto, en ciertas ocasiones, se desestiman en favor de especies más dóciles como la oveja y la cabra.

En cuanto a las ovejas o las cabras están disponibles en gran número siendo relativamente baratas, fáciles de manejar y alojar (258). Su precio puede ser 4 o 5 veces menor que el de un Beagle criado para la experimentación. En los últimos años su uso en investigación ortopédica ha aumentado, probablemente porque al ser animales destinados a la alimentación, su empleo provoca menos rechazo en la opinión pública (258). En comparación con las ovejas, las cabras tienden a tener una naturaleza más inquisitiva e interactiva, lo que puede hacer que el confinamiento durante períodos prolongados sea más desafiante con estos animales (258). Diversos estudios han empleado estos modelos animales para investigar diversos procedimientos de ROG: ovejas (275–279) y cabras (280–282). Las ovejas o las cabras tienen un peso corporal similar a los humanos adultos, siendo su tamaño adecuado para la colocación de múltiples implantes por animal (258). En cuanto a la composición mineral no se muestran diferencias significativas con respecto a los humanos (254). La literatura informa que son modelos animales adecuados para probar materiales e implantes humanos, ya que se considera que tienen una tasa metabólica y una tasa de remodelación ósea similar a la de los humanos (254). En cuanto a la microestructura existen diferencias con respecto al hueso humano; se ha descrito una mayor densidad ósea trabecular y una estructura ósea predominantemente primaria en estos animales, aunque el remodelado haversiano se convierte en más prevalente con la edad y también hay diferencias entre los diferentes huesos (254).

Con la excepción de los roedores, los conejos son los animales empleados con menos similitud a los humanos. Aunque la macroestructura y microestructura de los huesos del conejo es diferente al hueso humano (254,255,259) y el proceso de formación, remodelado y recambio óseo es más rápido (254,258,259,283), los conejos son comúnmente usados para el cribado de materiales de implantación previo al ensayo en modelos animales más grandes (254,255,269,284). De hecho, el conejo es uno de los animales más utilizados para la investigación médica, y se utiliza aproximadamente en el 35% de los estudios de investigación musculoesquelética (254,285). Debido a su tamaño y temperamento los conejos son fáciles de manejar (254,258), de mantener y de observar. Son más económicos que los animales de gran

tamaño (259) y son mejor aceptados como animales de experimentación por el público general (254). También es ventajoso el hecho de que los conejos alcanzan la madurez esquelética rápidamente, poco después de la madurez sexual, alrededor de los 6 meses de edad (258,286). La raza de conejos blancos neozelandesa es usada comúnmente para la investigación, siendo esta raza menos agresiva en la naturaleza y teniendo menos problemas de salud en comparación con otras razas (259).

Aunque los conejos son pequeños comparado con ovejas, cabras o cerdos, son suficientemente grandes para colocar múltiples implantes e incluso de uso humano, no siendo esto posible en las ratas. La colocación de múltiples implantes limita el número de animales necesarios para cada experimento y hace posible usarlos como sus propios controles (284,287).

El extendido uso y documentación de los conejos en la investigación biomédica hacen al modelo cada vez más atractivo para el análisis in vivo de la regeneración ósea. Además, las cuestiones económicas, científicas, prácticas y éticas hacen del conejo un modelo ideal para estudios de nuevos implantes y materiales de injerto. Las diferentes ubicaciones anatómicas de fácil acceso con cicatrización ósea endocondral (fémur, tibia) e intramembranosa (cráneo, mandíbula) permiten la prueba y el análisis de materiales en diferentes condiciones fisiológicas. (255)

Hay que tener en consideración que la mayoría de estudios con conejos, roedores, ovejas o cabras usaron modelos extraorales, siendo por el contrario más habituales los abordajes intraorales en perros y cerdos (263).

	Perro	Oveja/Cabra	Cerdo	Conejo
Macroestructura	++	+++	++	+
Microestructura	++	+	++	+
Composición ósea	+++	++	+++	++
Remodelado óseo	++	++	+++	+

Tabla 16: Resumen de los cuatro atributos clave en términos de similitud entre hueso animal y humano. Adaptado de "Animal models for implant biomaterial research in bone: a review" (254). + menos similar; ++ moderadamente similar; +++ más similar.

Ya que en general se prefiere utilizar animales de pequeño tamaño por razones éticas, económicas y de manejo, y su uso representa un paso previo a la experimentación con animales de mayor tamaño, los conejos parecen ser la primera opción en investigación implantológica y de regeneración tisular (255,263,288). En este animal los defectos intraorales y calvarios permiten una aproximación cercana (desarrollo embriológico) a la situación humana con respecto al proceso de osificación (255). Concretamente en el presente estudio se utilizó la calota de conejos blancos neozelandeses para estudiar la respuesta regenerativa tras la colocación del material de injerto con diferentes fuerzas de compresión.

El modelo experimental de calota de conejo ha sido utilizado y documentado ampliamente para la evaluación de materiales de injerto óseo, por su tamaño (a diferencia de los animales pequeños como ratones o ratas, la cirugía en la bóveda craneal del conejo permite un mayor control y precisión debido a su mayor tamaño anatómico), fácil manejo y buen acceso quirúrgico (255,289). El hueso del cráneo de los conejos está compuesto por una placa de hueso cortical interna y externa que recubre una capa de espacio de médula trabecular (255).

El tamaño del defecto es un aspecto crucial; el defecto de tamaño crítico (CDS) se ha usado como modelo experimental para evaluar la efectividad de biomateriales de nuevo desarrollo, evitando el sesgo de la regeneración ósea espontánea del defecto, si este no fuera crítico o fuera de cicatrización favorable (147,290). La definición original de CDS es la de aquel defecto intraóseo con el tamaño más pequeño, en un hueso determinado, de una especie concreta, a partir del cual no se produce una regeneración espontánea durante la vida del animal (291). Diferentes estudios han mostrado que para los conejos, un defecto de tamaño crítico en los huesos del cráneo es de alrededor de 15 mm (291–293). Pero la mayoría de los estudios preclínicos tienen un tiempo limitado de evaluación, por lo que defectos menores de 15 mm podrían ser considerados CDS en función del tiempo de sacrificio del animal. Por lo tanto, varios estudios propusieron como definición para el CDS como defecto de menor tamaño que no cura espontáneamente cuando se deja sin tratar en un determinado periodo de tiempo (294,295).

Al haberse demostrado que defectos de menor tamaño pueden considerarse críticos, usar estos defectos menores nos permite una reducción en el número de animales y una comparación directa entre diferentes situaciones o materiales en el mismo animal reduciendo así riesgo de errores por variaciones interindividuales (283,288,296–298). Muchos investigadores han utilizado este nuevo concepto de CDS para investigar eventos tempranos de la regeneración o comparar varios materiales (298). Se ha demostrado que la capacidad de cicatrización desde los

márgenes del defecto es constante en el mismo período de cicatrización independientemente del tamaño del defecto (298).

A pesar de que hay multitud de estudios que realizan 4 defectos (168,245,289,299–302) en la calota del conejo lo que permite probar más materiales en el mismo animal o disminuir el número de animales; en el presente estudio, como en otros (241–243,246,303–314), se decidió realizar dos defectos, uno en cada hueso parietal sin afectar a las suturas óseas. En primer lugar porque los procedimientos a analizar en el presente estudio fueron dos, además porque un mayor número de defectos resulta inevitablemente en defectos de menor tamaño y lo más importante porque se ha informado de diferentes capacidades de cicatrización entre los huesos frontales y parietales y esto podría deberse al hecho de que los huesos de la calota tienen dos orígenes embrionarios: cresta neural (huesos frontales) y mesodermo (huesos parietales) (288,315,316).

Ambos defectos fueron circulares, de 8 mm de diámetro y se realizaron a espesor parcial, éste tamaño se considera según diversos estudios un defecto de tamaño crítico teniendo en cuenta la duración de este estudio (6 semanas) (34,147,288,297,298,317–319).

A pesar de que no hay un consenso sobre los beneficios de la decorticalización (111,241,242), en este estudio se decorticalizan los defectos eliminando la cortical externa con la intención de obtener un mayor sangrado y acceso al espacio medular, que es un rico reservorio de células y mediadores de la formación ósea (255,299), y poder mejorar la unión física o interconexión entre el injerto y la zona huésped (111).

Al dejar intacta la cortical interna evitamos dañar la duramadre con las diferentes fuerzas de compresión; se ha visto que con éste abordaje se genera una menor morbilidad y se consigue un mayor contacto hueso-biomaterial (247). Otros estudios en calota de conejo también preservan la cortical interna (168,241,242,244,300,301,306,308,310,314,320).

La realización de defectos a espesor total podría conllevar riesgo de dañar la duramadre y de dislocación del sustituto óseo (321,322). Además los CDS bicorticales son difíciles de comparar porque tienen diferente profundidad (322), siendo ésta muchas veces insuficiente (255,322). En el presente estudio se encontraron diferencias de espesor entre las calotas de entre 1,18 y 2,8 mm siendo la profundidad media de 2,08 mm. En el estudio de Slotte y Lundgren de 2002 (242) donde se observó, entre otras cosas, el grosor y densidad de los huesos parietales de la calota de los conejos que formaron parte del estudio, se informó de que el grosor y la densidad del hueso del cráneo variaron considerablemente entre los animales, pero no entre las áreas

estudiadas en un mismo animal. Aunque se han descrito diferencias en la actividad de neoformación ósea, en relación con el grosor y la densidad de las calotas entre diferentes animales (242,304,323) esto no ha representado en este estudio un factor de confusión, puesto que las comparaciones entre los resultados en relación a las fuerzas de compresión aplicadas, se pudieron hacer dentro de un mismo animal dando mayor valor al estudio (284).

Mantener intacta la cortical interna nos permitió (al evitar daños en la duramadre con las diferentes fuerzas de compresión) probar fuerzas de compresión relacionadas con las habitualmente empleadas en clínica (82 y 186 gf). De hecho el primer estudio que probó diferentes fuerzas de compresión durante la colocación del injerto óseo y que empleó un diseño similar en calotas de conejo (34), realizó defectos bicorticales y eso les obligó a probar fuerzas muy por debajo de la fuerza media normalmente empleada en clínica (4,1 y 8,2 g) (249).

Para preparar un sitio de prueba definido y circunscrito en el cráneo del conejo, un enfoque práctico es colocar cilindros de titanio huecos circundantes al área de los defectos (243). Por ello en el presente estudio, mediante una técnica sencilla, se fijaron dos cilindros de titanio. Muchos estudios han utilizado modelos experimentales similares en la calota del conejo para examinar ROG y probar diferentes sustitutos óseos (168,241–245,299–301,303–305,307–314,323–330). Este modelo representa un buen modelo de osteoconducción (241,243,299,311) donde se obtiene regeneración ósea vertical más allá de la envoltura esquelética (241,255,307–309,324), resultando una herramienta útil para cuantificar regeneración ósea bajo condiciones variables o con diferentes biomateriales (241,243,311).

Con éstos cilindros se genera un adecuado sellado periférico creando así un espacio aislado para el material de injerto evitando la interferencia con tejidos blandos adyacentes durante la cicatrización ósea (244,255,309–313,327,328), se favorece la estandarización del volumen del injerto (244,310–313,328), se consigue suficiente estabilidad mediante un anclaje estable o conexión inmóvil entre el dispositivo y el hueso (328); además, el titanio es biocompatible, rígido y representa una barrera con oclusividad completa (308,324); características todas ellas que le confieren al modelo un alto grado de predictibilidad (324).

Concretamente los cilindros utilizados en el presente estudio dan como resultado defectos de 6,9 mm de diámetro y 4 mm de altura, se pudieron fijar de una forma sencilla, rápida y segura durante la cirugía. Estos cilindros permanecieron en su posición original durante toda la duración del estudio. Este tipo de defecto resultante representa un defecto de una pared donde los vasos y

las células provienen de la calota del animal. Se produce por tanto una regeneración ósea vertical en condiciones exigentes.

En el presente estudio se ha optado por utilizar un injerto particulado de origen bovino ya que es un sustituto óseo ampliamente utilizado para el relleno de defectos óseos en los maxilares (161,331,332). Las propiedades fisicoquímicas de la hidroxiapatita xenogénica bovina son similares a las del hueso esponjoso humano aunque variaciones en el proceso de producción pueden causar diferencias morfológicas, químicas, de la cristalinidad y en las impurezas que pueden afectar a los resultados (172). La decisión de cubrir ambos defectos con una única membrana es evitar diferencias entre los grupos debido a posibles diferencias en la estabilización de la misma.

A la hora de suturar, se consiguió cierre primario a pesar del significativo mayor volumen creado en la calota del animal tras la colocación de los cilindros. Entre otras, ésta es una de las causas por las que se optó por colocar únicamente dos cilindros por calota en vez de cuatro ya que tras su colocación es importante conseguir un adecuado cierre primario de la zona. Ya se ha explicado anteriormente que sin un correcto cierre primario o si se generan dehiscencias en la herida durante el proceso de cicatrización, los resultados en cuanto a regeneración ósea se verán seriamente afectados.

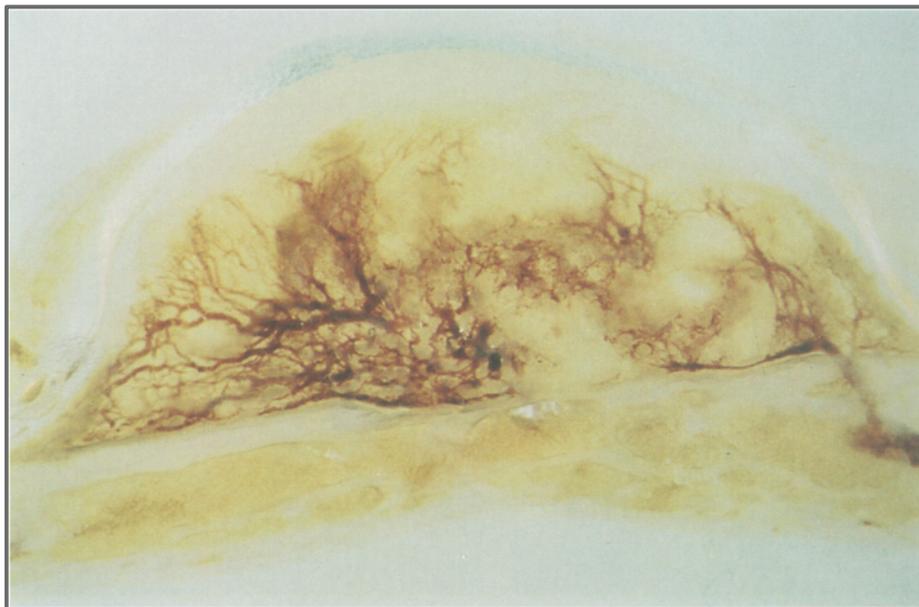
La elección del tiempo de duración del presente estudio (6 semanas) está basado en estudios previos (34,299) y con la intención de poder realizar, en cierta medida, una comparación con el artículo de Romanos y cols. (34) que estudian la influencia de la fuerza de compresión de los injertos óseos en calota de conejo. Además, varios autores consideran que cuatro semanas es suficiente para observar angiogénesis y formación ósea en varios modelos animales, incluyendo los conejos (112,193,299,307,310,311). La fracción de hueso mineralizado en el nuevo tejido generado parece tender a aumentar con tiempos de duración mayores, aunque éste aumento no es significativo (303,330).

Para la presentación de este estudio se siguió la guía ARRIVE (Animals in Research: Reporting In vivo Experiments) que da indicaciones para la presentación de experimentos in vivo en investigación animal (248), con la intención de conseguir un estudio más reproducible y una adecuada comunicación de los hallazgos. Esta guía se desarrolló siguiendo la Declaración Consort (normas consolidadas para informar y publicar estudios) y consiste en una lista de verificación que describe la información mínima que deben incluir todas las publicaciones científicas que informan sobre investigaciones con animales para promover informes completos

y de alta calidad, que permitan una revisión crítica de lo que se hizo y lo que se encontró; maximizando la disponibilidad y utilidad de la información obtenida de cada animal y cada experimento, evitando el uso innecesario de animales en el futuro. Además, durante el diseño y realización de la investigación se ha seguido el principio de las “3Rs” (reemplazo, reducción, refinamiento) para la protección animal en investigación.

### 5.1.2. Sobre las variables dependientes analizadas

Se han empleado numerosos métodos para observar la vascularización y neoformación ósea durante los procesos de formación y regeneración ósea (Fig. 80), siendo la histología el método más comúnmente utilizado.



*Fig. 80: Imagen de la vascularización en un modelo de regeneración ósea en calota de conejo con hemiesferas de ácido poliláctico. Foto tomada sin tinción y con magnificación. “The significance of angiogenesis in guided bone regeneration” (112).*

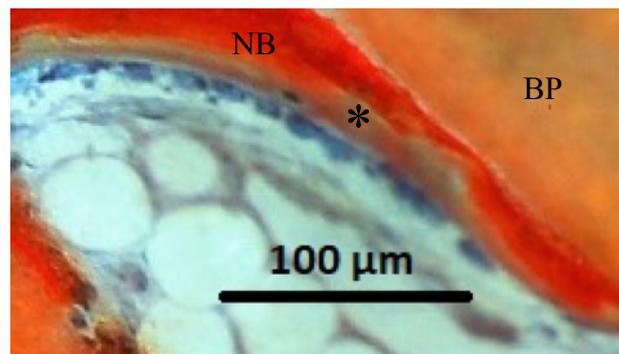
En el presente estudio, tras fijar (etanol 96°) y embeber en metilmetacrilato las muestras sin descalcificar, se cortaron y se tiñeron con Azul de Stevenel y picrofucsina de Van Gieson. La tinción azul de Stevenel contiene azul de metileno y permanganato de potasio y la tinción de picrofucsina de Van Gieson contiene fucsina ácida y ácido pícrico. Esta tinción está formulada para la penetración y tinción de muestras incrustadas en polímeros (333), es muy estable y

permite analizar las muestras sin descalcificar y que contengan elementos metálicos.

Las técnicas histológicas sin descalcificar se han impuesto en el análisis de las técnicas de aumento óseo, en el análisis de la aposición ósea a diferentes biomateriales, así como en la valoración y cuantificación de la aposición ósea sobre implantes aloplásticos (334).

La descalcificación que se realiza con frecuencia a las muestras de tejido óseo para la obtención de un tejido suficientemente blando para su inclusión en parafina y posterior análisis histológico tiene una serie de inconvenientes debido a la modificación que sufre la muestra, entre ellos no permite distinguir entre el hueso mineralizado y no mineralizado haciendo imposible la cuantificación del tejido osteoide o tejido óseo inmaduro. Con el desarrollo técnico de medios duros de inclusión (monómeros plásticos), de microtomos y sistemas de corte especiales se ha permitido cortar el hueso sin descalcificarlo y de esta manera permitir un análisis de la muestra con una menor alteración por el procesado. Las muestras no descalcificadas nos permiten diferenciar adecuadamente diversos linajes celulares (OCs en zonas de reabsorción, OBs asociados al osteoide, osteocitos) y el hueso neoformado inmaduro del hueso remodelado maduro. Con esta técnica se puede valorar la formación y maduración del hueso de manera cronológica. Con respecto a los sustitutos óseos, esta técnica sin descalcificar permite valorar la integridad del biomaterial y cuantificar el hueso que crece en la interfase pudiendo analizar la capacidad de reabsorción de los materiales osteoconductores utilizados en regeneración ósea. (334)

La tinción que se empleó en este estudio (Azul de Stevenel/Picrofucsina de Van Gieson) es excelente para demostrar formación osteoide y aposición directa de hueso sobre un biomaterial (Fig. 81) (335). El aspecto final del color de las secciones histológicas fotografiadas puede variar según la fuente de luz, el grosor de las secciones y la corrección del color con filtros (333).



*Fig. 81: Muestra del presente estudio. Tinción Azul de Stevenel. Se observa el nuevo hueso (NB) en contacto con la partícula de biomaterial (BP) y una línea de OBs formando matriz osteoide (\*).*

Mediante esta técnica histológica empleada se pudo medir el porcentaje de nuevo tejido óseo mineralizado formado con respecto al área total de cada región de interés (NBF), el porcentaje de partículas presentes en cada región de interés en contacto directo con el nuevo hueso formado (BBC) y el número (BV) y área de vasos sanguíneos (BVA) presentes en la muestra para poder comparar la neoformación ósea y vascularización resultante tras la realización de dos fuerzas de compresión diferentes durante la colocación del biomaterial particulado en los defectos óseos.

Sin embargo los especímenes histológicos no pueden mostrar una representación precisa de la estructura ósea tridimensional (330). Además, la histología de secciones no descalcificadas inevitablemente pierde una cantidad sustancial de material entre las secciones, por lo tanto los cálculos del volumen sólo podrían realizarse mediante una extrapolación aproximada y por tanto no se suelen tener en cuenta (336). Otras posibles limitaciones de la histología que se han descrito son: ser relativamente subjetiva, no ser realmente cuantitativa, permitir sólo un análisis en dos dimensiones (sin información de la disposición geométrica) y analizar sólo una sección de toda la muestra que no necesariamente tiene que ser representativa del total de la muestra (337,338).

Últimamente está surgiendo un gran interés en el análisis con micro-CT de los resultados de estudios con sustitutos óseos en procedimientos de ROG ya que es una técnica sencilla y no invasiva que nos permite valorar el volumen de nuevo hueso formado. Además esta técnica aporta información sobre la estructura tridimensional del tejido analizado (porosidad, grosor, orientación y tamaño trabecular,...) permitiendo una determinación automática de los índices morfométricos tridimensionales (339). Al no necesitar procesar las muestras para el análisis con

micro-CT, esta técnica permite una posterior preparación de las muestras para realizar otros métodos de análisis como la histología.

El micro-CT también se ha empleado para observar la distribución de los vasos sanguíneos; para ello es necesaria la inyección de una sustancia radioopaca (agente de contraste perfundido) post-mortem en el sistema sanguíneo del animal. Este método permite una evaluación precisa y rápida; realiza un análisis 3D de la vascularización (microarquitectura) y ofrece un análisis de datos objetivo del total de la muestra (337,338).

No obstante el micro-CT cuenta con sus propias limitaciones. En cuanto a la evaluación del tejido óseo podemos destacar que mediante el análisis con micro-CT no se puede identificar el tipo celular y de tejido presente en cada zona del análisis; en el modelo del presente estudio donde se emplea una barrera oclusiva de titanio para delimitar el defecto, la dispersión haría imposible distinguir neoformación ósea en las inmediaciones del metal (306,336). Además, la neoformación ósea en contacto íntimo con el hueso de la calota original no se puede medir de manera precisa, ya que generalmente se dibuja arbitrariamente desde las bases del cilindro una línea que delimita la calota del conejo, considerándose todo el hueso que hay por encima nuevo hueso formado (336).

Como limitaciones del micro-CT con contraste para la observación de la vascularización se han descrito: la necesidad en ocasiones de descalcificar las muestras para distinguir adecuadamente los vasos sanguíneos de los tejidos adyacentes debido a que el hueso no permite generalmente una adecuada visualización (337,340). Si se aumenta la concentración de estos agentes de contraste, mejora su visualización evitando la descalcificación de la muestra pero aumenta la viscosidad influyendo negativamente en su capacidad de perfusión (337,340). Además, los vasos pequeños, débiles e inmaduros podrían romperse por lo que no habría que elevar la presión de perfusión por encima de los niveles fisiológicos (340). Teniendo en cuenta que los vasos sanguíneos de los animales pequeños son extremadamente delgados, la elección de las condiciones de perfusión, incluyendo los vasos perfundidos, el líquido perfundido y la presión de perfusión deben considerarse cuidadosamente (219). Cualquier técnica basada en perfusión asume que el agente de contraste rellena completamente la vasculatura y no filtra hacia tejidos adyacentes (341), pero se ha observado un relleno incompleto de los vasos sanguíneos (342) y limitaciones para observar pequeños vasos ( $<20 \mu\text{m}$  de diámetro) (343).

Así pues, aunque el análisis histológico es un proceso más lento y que modifica las muestras de manera permanente, permite diferenciar el material implantado del hueso adyacente

(biomaterial, cilindro), hecho que no siempre es identificable en el estudio con micro-CT. Además, permite identificar el tipo celular y de tejido presente en cada zona del análisis.

Un análisis de las variables más completo se habría conseguido con el empleo de varias técnicas (por ejemplo, micro-CT e histología), pero no ha sido posible la realización de más de una técnica en el presente estudio debido a la ausencia de recursos económicos, eligiendo por ello la técnica que nos diese una información más precisa de las variables que quisimos analizar. La histología es una técnica aceptada y bien documentada para medir las variables del presente estudio. Además, diversos autores han observado una adecuada correlación entre los resultados obtenidos mediante histología y mediante micro-CT, como Maréchal y cols. (336) en un modelo similar (que empleó capuchones de titanio en calotas de conejos) donde se analizó el volumen óseo. También se observó una buena precisión en los resultados en cuanto a la estructura trabecular, densidad y volumen óseo con ambos métodos en los estudios con biopsias de cadáveres humanos de Müller y cols. (339) y Kuhn y cols. (344).

En los últimos años el análisis inmunohistoquímico también se ha utilizado ampliamente para valorar la vascularización. Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a sus correspondientes antígenos (marcadores de estructuras celulares). Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia fluorescente o que produce coloración. Los anticuerpos más utilizados para resaltar los vasos sanguíneos son para los antígenos CD34, CD31, factor de von Willebrand (vWF) y VEGF; no obstante, se ha descrito que la expresión de antígenos de las células endoteliales varía entre diferentes subtipos de vasos y diferentes compartimentos anatómicos de un mismo órgano (345).

## 5.2. DISCUSIÓN SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

A pesar de los significativamente mejores resultados de la ROG observados en los artículos previos cuando se realizan mayores fuerzas de compresión sobre los materiales de injerto óseo (34,239,240) y de los diferentes razonamientos que abogan por realizar una mayor fuerza de compresión, como la de eliminar micromovimientos (32–34), obtener mayores contactos entre las partículas (239,240) y menores huecos entre las mismas (34,239), obtener mayor estabilidad en el andamiaje (239), etc.; no parece según los resultados del presente estudio y teniendo en cuenta sus limitaciones, que con el rango de fuerzas que habitualmente usamos en clínica haya diferencias significativas en cuanto a la formación ósea o la vascularización. En el presente trabajo, se muestra a las 6 semanas, que la aplicación de presiones de  $0,7 \text{ kg/cm}^2$  y de  $1,6 \text{ kg/cm}^2$  sobre un sustituto óseo particulado de origen bovino, permitieron una neoformación ósea y una vascularización similar en un modelo de calota de conejo.

Los resultados del presente estudio mostraron una buena curación y una formación ósea vertical más allá de la envoltura esquelética. Se ha podido observar a las 6 semanas una neoformación ósea (NBF) de  $29.0 \pm 8.8\%$  (ROI1) y  $4.9 \pm 5.1\%$  (ROI2) en los defectos regenerados con un biomaterial particulado comprimido a  $82 \text{ gf}$  ( $0,7 \text{ Kg/cm}^2$ ); por otro lado en los defectos con el biomaterial colocado a  $186 \text{ gf}$  ( $1,6 \text{ Kg/cm}^2$ ), se observó un NBF de  $27.6 \pm 8.2\%$  (ROI1) y  $5.7 \pm 4.7\%$  (ROI2) mostrando éstos resultados la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p > 0,05$ ).

Esta cantidad de nuevo tejido mineralizado se podría correlacionar con la obtenida en estudios previos con modelos experimentales similares en calota de conejo. En los estudios llevados a cabo tras un mes de cicatrización se observó un nuevo tejido mineralizado en el defecto en modelos que empleaban capuchones hemiesféricos de titanio de  $8 \text{ mm}$  de diámetro y  $4 \text{ mm}$  de altura de entre  $22,4 \pm 4,1\%$  (cuando no se hicieron perforaciones en la cortical externa de la calota) y  $27,8 \pm 3,5\%$  (con perforaciones corticales) (314); y de entre  $27,7 \pm 4,8\%$  (cuando se emplearon capuchones con perforaciones) y  $30,8 \pm 6,4\%$  (con cacuchones sin perforaciones) (308); entre  $30,3 \pm 7,2\%$  (cuando se rellenaron los defectos con partículas medianas de  $250\text{-}500 \mu\text{m}$  de  $\beta\text{-TCP}$ ) y  $33,7 \pm 11,1\%$  (en el control, cuando se dejaron los defectos sin rellenar) (309); entre  $29,4 \pm 3,7\%$  (cuando se rellenaron los defectos con cemento de fosfato de calcio) y  $30,4 \pm 4,2\%$  (en el control) (305). A las 8 semanas en defectos circunscritos con cilindros de titanio de  $7 \text{ mm}$  de altura y  $7 \text{ mm}$  de diámetro exterior se observó una neoformación ósea de entre  $13,96 \pm 5,98\%$  en el control y  $30,15 \pm 7,63\%$  al emplear una matriz con hidroxiapatita y fosfato tricálcico

junto con 30 mg/ml de BMP-2 (168). Éstos estudios no permiten comparaciones directas entre ellos o con el presente trabajo, debido a las diferencias en la morfología del cilindro, las formas de medición, los diferentes períodos de observación o los diferentes materiales utilizados para la regeneración. Hay que tener en cuenta que el nuevo tejido óseo formado más allá de la envoltura esquelética se ha visto en estudios previos que tiene una densidad menor a la del hueso basal de la calota (304,323,324), lo cual se atribuye a la ausencia de carga funcional en esa zona (304,324).

En el presente estudio se obtuvieron unos elevados valores de BBC (en ROI1 alrededor del 60-70%), demostrándose una adecuada integración de las partículas del injerto (Cerabone<sup>®</sup>, Botiss Biomaterials GmbH, Zossen, Alemania), pudiéndose observar en las imágenes histológicas aposición directa de osteoide. Aunque las diferencias entre las fuerzas de compresión tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p > 0,05$ ).

El rango de valores de BBC del presente estudio fue similar a aquellos descritos en otros estudios en calotas de conejos usando diferentes materiales de injerto tras 8 semanas de cicatrización: como en el estudio de Jung y cols. de 2008 donde observaron un BBC de  $55,18 \pm 19,67\%$  al emplear una matriz con hidroxiapatita y fosfato tricálcico junto con 30 mg/ml de BMP-2 en defectos circunscritos con cilindros de titanio de 7 mm de altura y 7 mm de diámetro exterior (168), o en el estudio de Okazaki y cols. de 2005 donde observaron un BBC de  $68,76 \pm 5,16\%$  en los dos milímetros más cercanos a la calota al emplear partículas de hueso desproteinizado en defectos cubiertos con membrana de e-PTFE reforzada (329); aunque al igual que con el nuevo tejido mineralizado, no se pueden realizar comparaciones directas.

Tampoco se observaron en los resultados de este estudio diferencias significativas en la vascularización (BV y BVA) con las diferentes fuerzas de compresión ( $p > 0,05$ ), siendo los huesos parietales un buen modelo de experimentación por la similitud entre ambos en cuanto a la vascularización y calidad ósea (326).

A pesar de la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con las dos fuerzas de compresión, donde sí se observaron diferencias significativas es entre ambas regiones de interés ( $p=0,008$ ). Se pudo observar una mayor formación ósea y una mayor integración del material en la zona más cercana al hueso nativo ó ROI1 en todas las muestras. Estos resultados son acordes con los mostrados en otros artículos con modelos experimentales similares que miden los resultados en diferentes zonas del defecto

(300,301,311,329) y se debe a que se representa una situación de defecto de una pared, donde el origen de los nuevos vasos y células para la formación ósea es exclusivamente la calota (246,274,327). Existe la posibilidad de que la tasa de migración o el número de células osteoprogenitoras de la penetración intramedular de la placa cortical no sea suficiente o tan rápida como para generar de manera eficiente tejido óseo nuevo en la parte más distal del área aumentada en este periodo de cicatrización.

Así pues, los resultados del presente estudio se suman a los obtenidos en los artículos publicados hasta la fecha que investigan el papel de la fuerza de compresión del biomaterial particulado en los resultados de regeneración ósea (34,239,240).

En el estudio de Romanos y cols. (34) se evaluaron las diferentes fuerzas de compresión sobre 0,12 gramos de un biomaterial sintético particulado (Osteon®: HA 70%/β-TCP 30%; tamaño de partícula de 1,0-2,0 mm y poros interconectados de 300-500 μm) en un modelo de calota de conejo parecido al de nuestro estudio. Tras 6 semanas de cicatrización, observaron un cierre de defectos significativamente mejor y una mayor formación de hueso cuando se utilizó una mayor fuerza de compresión. Los defectos eran a espesor total, lo que únicamente permitió probar fuerzas bajas de 4,1 y 8,2 g ( $<0,029 \text{ kg/cm}^2$ ). Estas fuerzas, ejercidas con monedas envueltas en papel de aluminio, son menores que las comúnmente utilizadas en clínica como se mostró en nuestro estudio in vitro previo (249), y probablemente estén sobreestimadas porque el diámetro del material compactador (monedas) es mayor que el diámetro del defecto, lo que hará que el material compactador choque con los bordes del defecto sin conocer la presión efectiva resultante sobre el biomaterial.

Delgado-Ruiz y cols. (239) en un modelo de preservación alveolar en perros probaron un rango de fuerzas más equiparable a los realizados en clínica (10-200 g o presiones de 0,1 a 1,6  $\text{Kg/cm}^2$ ) para compactar un biomaterial sintético particulado (Straumann Bone Ceramic®: HA 60%/β-TCP 40%; tamaño de partícula de 0,5 a 1,0 mm y poros interconectados 90-95%). Dos meses después observaron que las fuerzas de compresión más altas facilitaron la distribución del injerto particulado en el alvéolo y la formación de hueso. Pero el modo de compactación (con pesas colocadas sobre un compactador manual con una parte activa de 4 mm de diámetro) no es extrapolable a la clínica, además no se tiene en cuenta la cantidad de biomaterial que se introduce en cada alveolo lo que puede representar un importante factor de confusión ya que algunos autores defienden que a mayor cantidad de biomaterial, se produciría una mayor

proliferación de OBs (346), probablemente debido al aumento de superficie disponible para la adhesión y crecimiento celular (346).

Por su parte, Cho y cols. (240) evaluaron las diferentes fuerzas de compresión en un modelo de preservación alveolar en humanos; probaron fuerzas (510 y 3059 gf; en presión: 1,8 y 10,8 Kg/cm<sup>2</sup>) por encima del rango habitualmente usado en clínica; de hecho al emplear la mayor fuerza de compresión, los pacientes experimentaban molestias o dolor según describieron los autores. Aun así, tras 4 meses de cicatrización se observó que la aplicación de una mayor fuerza de compresión mejoró significativamente la formación de hueso nuevo. En ese estudio hubo un sesgo de confusión importante, en relación con las variaciones entre los tamaños de los alveolos, las diferentes causas de extracción dental y las diferentes localizaciones de los mismos (maxilar o mandíbula). En cuanto al biomaterial que utilizaron (250 mg de Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen que se recortó en 12 piezas para ser empaquetadas), contiene un agente colagenado aglutinante para facilitar su manejo (347), que une cohesivamente los gránulos para formar un bloque (348,349) y podría tener cierta influencia en los resultados. Además, se sigue sin emplear un método de compactación con adecuada manejabilidad clínica (dinamómetro digital de uso industrial con parte activa de 6,0 mm de diámetro).

Hay que destacar que los resultados de éstos estudios son difícilmente comparables entre sí y con los del presente trabajo, debido a los diferentes modelos experimentales empleados, diferentes fuerzas de compresión probadas y diferentes materiales empleados (Osteon<sup>®</sup>, Straumann<sup>®</sup> Bone Ceramic, Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen, Cerabone<sup>®</sup>).

Los resultados del presente estudio son difícilmente extrapolables a los de otros en los que se emplean diferentes materiales de injerto óseo (34,145,172,350). Hay que tener en cuenta que diferentes materiales tienen diferentes módulos y límites elásticos (145,192,350,351) demostrando distinta flexibilidad y rigidez, pudiendo hacer falta diferentes fuerzas para generar una respuesta elástica o plástica o incluso microfracturas en ellos. Con un mayor módulo elástico o módulo de Young se obtiene una mejor protección contra el estrés y un adecuado comportamiento bajo aplicaciones elevadas de carga (351). El módulo elástico de los materiales xenógenos bovinos es en general similar al del hueso humano, aunque dependiente del procesado como ya hemos descrito anteriormente (145,350). Algunos materiales sintéticos observados tienen módulos de Young muy superiores a los del hueso humano (145), aunque hay una amplia variabilidad en este grupo. En cuanto a los aloinjertos, el módulo de Young en el FDDBA se reduce un 20% comparado con el hueso fresco y en el DFDBA disminuye significativamente

(145). Esto influirá en la diferente resistencia mecánica a la compresión que ofrezcan los diferentes materiales, aunque según una revisión de la literatura reciente, la resistencia mecánica a la compresión depende más del tamaño de la partícula que de las propiedades mecánicas generales del material (145). Se ha sugerido que la migración y diferenciación celular también podría estar influenciada por la rigidez del material (173,352,353).

Al aumentar la presión de compactación se podría obtener una mayor estabilidad con un mayor contacto entre partículas y por tanto un menor espacio entre ellas podría prevenir micromovimientos en el injerto; esto es importante ya que los micromovimientos en las zonas injertadas durante la cicatrización alteran la regeneración ósea induciendo la formación de tejido blando alrededor de los gránulos (139,354,355). Con suficiente estabilidad inicial, el infiltrado temprano de tejido a través de los poros se diferenciará en hueso por formación ósea directa o crecimiento óseo aposicional desde el hueso adyacente (356). La formación de una nueva red vascular, que es un prerrequisito para la formación ósea, es también altamente sensible a las condiciones mecánicas necesitando una adecuada estabilidad para su correcto desarrollo (237,238). Además, la presión de los tejidos adyacentes podría disminuir el volumen de la masa de injerto particulado o de las partículas durante la formación ósea por lo que una adecuada estabilidad para soportar esas presiones es necesaria (145). Pero por otro lado, no hay que olvidar que los espacios interparticulares deben ser suficientemente grandes como para permitir la penetración vascular y a las células óseas migrar con facilidad para formar hueso (166). Se ha sugerido por tanto que la fuerza de compactación y la fricción entre las partículas también influyen en ese espacio vacío intergranular y por tanto en las propiedades osteoconductoras y biodegradación del injerto particulado (357).

La disminución del espacio interparticular o intergránulo observada en nuestro piloto mediante micro-CT, cuando se emplean fuerzas de compresión mayores, hipotéticamente podría influir especialmente en los injertos óseos con menor porosidad ya que los capilares y las células perivasculares deben poder formarse y migrar con facilidad dentro de los pequeños espacios provistos por el material de sostén (22,97), aunque harían falta más estudios para demostrar esta teoría.

Es importante recordar que los resultados del análisis realizado con micro-CT confirman que con las presiones de compactación usadas en este estudio, no sólo se disminuye el espacio entre las partículas, sino que también se genera rotura de partículas (Tabla 12; Fig. 59). Esto ya se ha observado en los artículos previos que evalúan el papel de la compresión sobre el sustituto óseo

particulado, donde consideran que las microfracturas de las partículas podrían contribuir a la formación ósea debido a un mayor contacto entre las partículas adyacentes y un tamaño de partícula resultante menor lo que conllevaría una reabsorción y reemplazo más rápido (239,240). A pesar de lo expuesto, en el presente estudio in vivo no se observan diferencias en los resultados en cuanto a regeneración ósea.

En el campo de la ortopedia, durante las cirugías de revisión en las artroplastias totales de cadera, se colocan injertos por impactación para darles forma y estabilidad y conseguir restaurar una masa ósea adecuada para minimizar el riesgo de fractura o micromovimientos. En este campo se realizó un estudio animal que usó injerto impactado y no impactado de partículas de titanio. En él que se observó un menor crecimiento óseo al impactar este material; las muestras con partículas compactadas redujeron el espacio intra e interpartícula y se observó una reducción en la osteoconducción (358).

Un estudio con un modelo experimental similar al del presente trabajo (4 defectos circulares de 6 mm de diámetro a espesor total en calotas de conejo) esperaba obtener al emplear diferentes tamaños de partícula de injerto autógeno un diferente desarrollo en el número de vasos sanguíneos debido al diferente espacio interparticular que generan para la penetración vascular; pero de forma similar a lo observado en el presente estudio, los resultados mostraron para ambas muestras (partículas de 0,5-2,0 mm<sup>3</sup> y de 10,0 mm<sup>3</sup>) suficiente revascularización independientemente del tamaño de la partícula (147).

Por un lado, parece según el estudio en conejos de Bai y cols. de 2010 (193) que los injertos óseos con tamaños de poro menores de 400 µm limitan el crecimiento de los vasos sanguíneos dentro del biomaterial, mientras que el aumento del tamaño de poro por encima de este valor no tuvo un efecto significativo en la formación vascular, lo que indica que el límite superior del tamaño de poro para mejorar la vascularización es de 400 µm.

Por otro lado, se ha sugerido que una mejora en la angiogénesis no causa necesariamente una estimulación de la neoformación ósea, ya que hay un momento en el que cuando se alcanza el número de vasos suficiente se estabiliza la cantidad de neoformación ósea. (359)

También hay que tener en cuenta que en el sistema esquelético los vasos sanguíneos son heterogéneos y funcionalmente especializados (226), habiéndose identificado en estudios recientes varios tipos o subpoblaciones de células endoteliales, siendo los capilares tipo H (que representan un pequeño porcentaje del total de capilares óseos) los que más se relacionan con las

células osteoprogenitoras y por consiguiente con el proceso de regeneración ósea (226). De hecho, una probable explicación de por qué la formación ósea ocurre sin tejido cicatricial proviene de la población específica de células endoteliales tipo H presentes en la vasculatura ósea (360).

Los diferentes tipos de vasos se distinguieron mediante inmunohistoquímica, las células endoteliales óseas (y las del hígado) expresan CD31 y Endomucina (Emcn); las células endoteliales tubulares son fuertemente positivas a CD31 y Emcn mientras que los vasos sinusoides son levemente positivos a CD31 y Emcn, esto estableció la existencia de heterogeneidad espacial y fenotípica en el endotelio de los huesos. Denominaron vasos óseos tipo H a los vasos sanguíneos altamente positivos en CD31 y Emcn y tipo L a los levemente positivos. Se observó en este estudio que las células osteoprogenitoras estaban posicionadas selectivamente alrededor de los vasos tipo H pero no de los tipo L. De hecho aunque las células endoteliales tipo H representan menos del 2% de las células endoteliales del hueso, la mayoría de las células osteoprogenitoras (70% células osterix-positivo y 82% de células Runx2 positivas) estaban posicionadas selectivamente alrededor de esos vasos, lo que sugiere que existe una importante interrelación entre la angiogénesis y la osteogénesis en este tipo de células endoteliales. (226) De acuerdo con esto, los dos subtipos de capilares óseos tienen perfiles de expresión específicos sugiriendo propiedades funcionales específicas. De hecho, la expresión de mRNA de los factores de crecimiento secretados con papel en la proliferación y supervivencia de células osteoprogenitoras se expresan significativamente más en las células endoteliales tipo H. (226) Precisamente, se ha descrito que con la edad el número de OBs disminuye y se reduce la osteogénesis, por lo que la calidad ósea y el potencial de cicatrización se deterioran y aumenta la frecuencia de las fracturas; estos cambios se correlacionan con la disminución de este subtipo de células endoteliales (tipo H) con el aumento de los años aunque el número total de células endoteliales en el hueso no cambia de forma significativa. (226)

Otro resultado importante observado en el presente estudio con el micro-CT es que  $0,20 \pm 0,01$  gramos de xenoinjerto particulado de 0,5-1,0 mm de tamaño de partícula resulta, previo a la compactación, en un volumen variable de las muestras. Es decir, a pesar de ser la misma cantidad en gramos de biomaterial, éste ocupa distinto volumen en las diferentes muestras ya que no se puede controlar el número de partículas de cada tamaño concreto que entran a formar parte de cada muestra (Fig. 82).



*Fig. 82: Muestra de Cerabone® de tamaño de partícula pequeño (0,5-1,0 mm). Se pueden observar las diferencias de tamaño entre las partículas.*

Además, la distribución del tamaño de partículas y la rugosidad de la superficie de los sustitutos óseos pueden ser diferentes de las especificaciones provistas por los fabricantes, pudiendo ésto influir en la porosidad intergranular, la osteoconductividad y la hidrofiliidad (172,361). De hecho, en un artículo reciente (361) se ha observado mediante difracción láser que para el Cerabone® de partículas de 0,5 a 1,0 mm, el tamaño medio de partícula es de 663,31 micras (percentil 50%) pero el rango de tamaños de las diferentes partículas que integran el vial de biomaterial es amplio y va desde 174,62 micras (percentil 10%) a 1337,48 micras (percentil 90%). Como ya se ha descrito anteriormente, diferente rango de tamaño de partículas, puede influir en la porosidad intergranular (172,194). La distribución de partículas del tamaño de 0,5 a 1,0 mm crea una adecuada porosidad intergránulo, gránulos menores de 0,5 mm disminuirán la porosidad intergránulo y retrasarán la penetración vascular (al disminuir la hidrofiliidad) (172).

En cuanto a la fuerza empleada para la compactación del biomaterial, otro rango de fuerzas podría ser probado, a efectos de determinar si hay una fuerza a partir de la cual se perjudica o favorece la formación ósea, ya que en el estudio de Cho y cols. (240) de preservación alveolar en humanos se observaron beneficios en cuanto a la neoformación ósea con el empleo de 3059 gf ó 10,8 Kg/cm<sup>2</sup> que es cuando el paciente nota dolor o molestias.

Aunque el rango de fuerzas probado en el presente estudio se correlaciona con las fuerzas habitualmente empleadas en clínica según el estudio previo realizado con 8 cirujanos, la realidad es que ese rango podría sufrir una amplísima variación. Por un lado, las diferencias entre los operadores fueron significativas lo que podría sugerir que si hacemos el estudio con 8 cirujanos diferentes el rango de fuerzas podría sufrir variaciones; además, la sensación totalmente subjetiva de la fuerza ejercida podría, en algunos casos, derivar en fuerzas excesivamente elevadas o suaves. Por otro lado, al ser habitual el empleo de diferentes instrumentos, a la diferente fuerza aplicada por el cirujano y al diferente número de compresiones, hay que añadirle las diferentes superficies activas del instrumento que ampliarían o disminuirían exponencialmente el rango de presiones resultantes realizadas sobre el injerto (Fig. 83 y Tabla 17). Lo que, como ya hemos explicado, influirá de forma diferente con las diferentes propiedades fisicoquímicas de los sustitutos óseos.

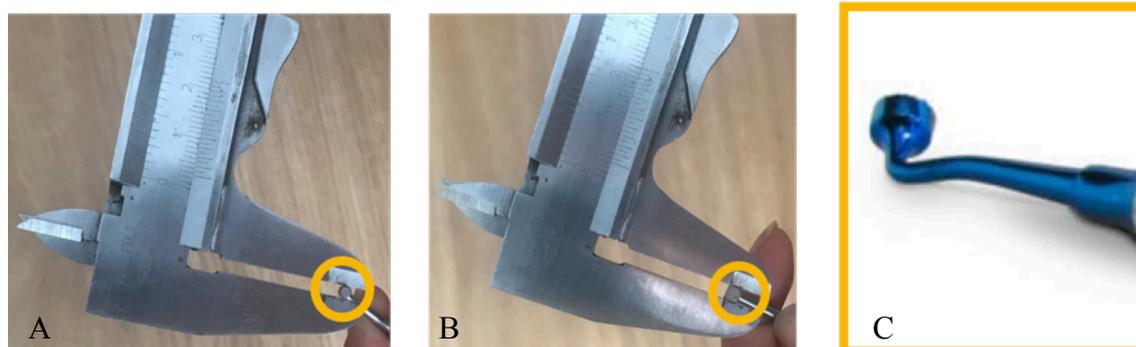


Fig. 83: A y B dos partes activas (2,6 y 3,1 mm) de un mismo instrumento y C instrumento con parte activa para la compactación de 8 mm.

Fuerza	Superficie Activa		
	2,6 mm	3,1 mm	8 mm
50 gf	0,94	0,66	0,09
82 gf	1,54	1,09	0,16
186 gf	3,50	2,46	0,37
300 gf	5,65	3,97	0,59
3000 gf	56,59	39,73	5,96

Tabla 17: Presiones resultantes sobre el material en  $\text{Kg/cm}^2$  en función de la fuerza aplicada y la parte activa del instrumento con el que se aplica la fuerza. gf: gramos fuerza.

### 5.3. RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

Los resultados obtenidos con este trabajo son relevantes tanto para la práctica clínica como para el diseño de futuras investigaciones relacionadas con este campo.

El presente estudio es el primero en utilizar para la compactación un instrumento, desarrollado por este grupo de investigación, con manejabilidad clínica, capaz de compactar de forma estandarizada y calibrada el biomaterial midiendo la fuerza que ejercemos sobre él. Además trabaja a un rango de fuerzas (0-186 gf) acorde con las usadas en clínica según el estudio previo realizado con 8 cirujanos orales experimentados.

El instrumento desarrollado para el presente trabajo de investigación nos podría permitir la obtención de mejores resultados durante la regeneración ósea ya que nos permitiría realizar técnicas más reproducibles, pero sobre todo permitiría una mejor estandarización de los estudios de investigación aplicada sobre los biomateriales particulados, eliminando un posible factor de confusión como podría ser la fuerza de compresión. Se generaría una compactación del material mucho más homogénea, con fuerzas conocidas y con menos variabilidad interindividual, controlando mejor los procedimientos.

Sería muy interesante el empleo de este instrumento para realizar nuevos estudios que evaluaran la influencia del tamaño de partícula del sustituto óseo (como los mostrados en la revisión de la literatura expuesta previamente en la Tabla 6), controlando la fuerza de compresión ya que ésta podría influir en la reorganización de las partículas y finalmente en el espacio interparticular que es clave en los resultados de estos estudios. Al estandarizar la fuerza aplicada evitaríamos un posible factor de confusión añadiendo un mayor valor a estos estudios.

En cuanto a las técnicas de preservación alveolar, podríamos usar este instrumento ya que el estudio de Delgado-Ruiz y cols. de 2018 (239) describe una mejor distribución del material particulado con el uso de mayores fuerzas de compresión. Por lo que parece de especial interés controlar la fuerza de compresión en los trabajos que evalúan la preservación del volumen óseo tras la extracción dental con diferentes materiales de sustitución ósea.

En los estudios de elevación de seno, ampliamente utilizados en investigación para probar biomateriales, nos serviría para obtener indirectamente una idea de la condensación final del biomaterial. Ya que los defectos de seno varían ampliamente en tamaño (diferentes tamaños de seno y diferente laxitud de la membrana de Schneider) y por tanto la cantidad de biomaterial que se suele introducir en cada seno es diferente. En este contexto, se generaría una menor

confusión si el material insertado ofreciese una resistencia similar a la compresión pudiendo conseguir condensaciones del material más homogéneas.

En el campo de la Odontología, la aparición de las sondas periodontales de segunda generación supuso un avance similar al que podría suponer el instrumento que se ha utilizado en esta tesis, ya que comparadas con las convencionales, estas sondas son capaces de realizar la medición con una fuerza controlada. El sondaje periodontal forma parte de una serie de métodos que se usan para diagnosticar y monitorizar a los pacientes con enfermedad periodontal (362,363). Debido a que con las sondas convencionales la fuerza aplicada durante el proceso de sondaje puede inducir a error (364–366); de hecho, se ha estimado que la fuerza de sondaje con sondas convencionales varía entre 3 y 140 gramos dependiendo de la localización a sondear y del profesional que realiza el sondaje (367), se ha recomendado el uso de sondas y presiones de sondaje estandarizadas para determinar la profundidad de sondaje y el sangrado al sondaje eliminando así la variabilidad en las evaluaciones. La fuerza controlada y estandarizada conseguida con las sondas periodontales de segunda generación (Sonda Florida o calibrada) produce un aumento en la reproductibilidad intra e inter- examinador (367) eliminando posibles errores en la medición y por tanto, son una mejor herramienta para el diagnóstico y control de estos pacientes, dando además mayor validez a los resultados de los estudios de investigación que la usan.

Los hallazgos del presente estudio sugieren que la aplicación de presiones de 0.7 y 1.6 kg/cm<sup>2</sup> para condensar la hidroxiapatita particulada de origen bovino permiten una consolidación del injerto adecuada y comparable en un modelo de aumento en calota de conejo. Parece, por tanto, que pequeñas variaciones en la fuerza durante la compresión de los materiales particulados (al menos en el rango probado en este estudio y con este biomaterial en concreto) no influyen en los resultados, ya sea en términos de formación de nuevo hueso o en términos de angiogénesis. La relevancia clínica de los hallazgos que se presentan en esta tesis aunque es valiosa debe interpretarse con precaución.

Esta investigación abre el camino a una aplicación clínica de este instrumento, ya que garantiza el uso de un rango controlado de fuerzas de acuerdo con el cual, teniendo en cuenta los resultados de este estudio, se permite una consolidación adecuada de este tipo de injerto. Parece que estandarizar la fuerza de compresión podría resultar en procedimientos más reproducibles tanto *in vitro* como *in vivo*.

#### 5.4. LIMITACIONES DEL PRESENTE ESTUDIO.

El estudio realizado ha evaluado el efecto de la fuerza de compresión sobre el material de injerto óseo particulado durante la regeneración ósea guiada. A pesar de la meticulosidad con la que se ha llevado a cabo, presenta algunas limitaciones que se exponen a continuación.

En primer lugar, podríamos considerar que la fuerza de compactación empleada no está perfectamente definida desde el punto de vista del factor tiempo de aplicación. No obstante la técnica habitual que se emplea en clínica no es una carga estática, sino sucesivas cargas de impacto, en las que el tiempo tiene menos valor. En el presente estudio se decidió aplicar 5 compresiones por defecto, lo cual resultó necesario ya que la dimensión de la parte activa del instrumento (similar a la de muchos instrumentos utilizados en clínica) es más pequeña que la dimensión de la superficie regenerada. Resultaría complicado determinar el número de compresiones que los clínicos realizan durante las cirugías, de manera que para el estudio se ha tenido que elegir un número que se ha considerado conveniente y que lograba disponer el injerto de manera eficiente en el volumen del cilindro.

Otra de las limitaciones del presente estudio, es que los resultados presentados aquí están restringidos a un único biomaterial particulado y son de difícil extrapolación a otro tipo de materiales, que cuentan con diferentes propiedades físico-químicas y mecánicas. No obstante, se eligió el material de injerto (xenoinjerto de origen bovino) que está más referenciado en estudios clínicos y en modelos animales y, probablemente, con mayor aplicación clínica.

También es importante tener en cuenta que el modelo de cilindro no necesariamente representa la situación clínica habitual, considerando las diferentes localizaciones anatómicas orales y la ausencia de estímulo biomecánico causado por el sistema masticatorio. Además, el modelo es vertical y no está contenido en el lecho óseo, lo que dificultó seriamente la formación de hueso en el área de interés (especialmente en ROI2). No hay que olvidar que a pesar de las similitudes en la fisiología de la regeneración y reparación ósea descritas por algunos autores entre éstos animales y los humanos (111,255,283,304), es difícil extrapolar los resultados experimentales relativos al ratio y cantidad de regeneración ósea a los humanos (111,304), por lo que éstos hallazgos deben de tomarse con cautela.

Un único tiempo de observación (6 semanas) podría haber ocultado posibles efectos en la angiogénesis en periodos más tempranos. En un estudio donde se realizaron 4 defectos circulares de 6 mm de diámetro a espesor total en calotas de conejo, se observó al emplear diferentes

tamaños de partícula de injerto autógeno un gran aumento del número de vasos sanguíneos de la primera a la segunda semana de cicatrización sin embargo, no se observaron diferencias a las 4 semanas; sugiriendo que entre la segunda y la cuarta semana está produciéndose el remodelado donde no hay una mayor formación de vasos sanguíneos (147). Otro estudio, donde se realizaron 4 defectos a espesor total de 5 mm de diámetro en calotas de conejo, que comparó el uso de injerto autógeno particulado y en forma de pasta; observó diferencias en la formación ósea a las 4 semanas pero no después de 15 semanas (368). Y finalmente otro trabajo con sustitutos óseos en conejos pero con diferente modelo experimental (implantaron  $\beta$ -TCP en la fascia lumbodorsalis del conejo donde hay gran cantidad de vasos sanguíneos para evaluar el papel del tamaño de los poros y su interconexión en la formación de los vasos sanguíneos), observó que la vascularización sufre un aumento significativo durante las primeras cuatro semanas pero no observó cambios significativos entre las cuatro y las ocho semanas (193).

Quizás, para darle mayor solidez a los resultados deberíamos de haber tenido un defecto control, pero asumiendo que el defecto empleado es crítico y no va a regenerarse espontáneamente y teniendo en cuenta el amplio aumento en el volumen subcutáneo a nivel de las calotas tras la colocación de los cilindros que nos obligó a colocar únicamente dos; preferimos sacrificar la información que nos hubiese podido proporcionar el control a favor de probar la variable de estudio dentro de un mismo animal.

No se puede obviar el diferente volumen observado con la misma cantidad (peso) de biomaterial en las muestras previo a la compresión. Aunque materiales más homogéneos pueden ser investigados clínicamente, generalmente se utilizan materiales particulados con diferente tamaño de partícula entremezclado (rango de tamaño de partícula) por lo que la situación evaluada en este estudio evidencia mejor la realidad clínica. El diferente volumen inicial al usar rangos de tamaño de partículas debería tenerse en cuenta en futuros estudios de investigación con biomateriales. Ya que la diferencia en el volumen con el empleo de rango de partículas podría indicar presencia de partículas de diferente tamaño en cada defecto o cilindro.

Finalmente, una limitación importante del presente estudio es el reducido tamaño muestral. No obstante, con el empleo de conejos se recomienda un mínimo de 4 animales para cada tratamiento o periodo de cicatrización (254), lo que se cumple en este estudio. Además los datos obtenidos de ambos grupos son muy similares siendo los valores de p elevados, lo que nos hace pensar que un aumento del tamaño muestral no terminaría ofreciendo una diferencia estadísticamente significativa.

## 5.5. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.

Este trabajo abre nuevas líneas de investigación con nuevos objetivos en torno al estudio de los efectos de la compactación de los materiales particulados. Aún considerando sus limitaciones, la metodología presentada resulta eficiente y puede ser fácilmente replicada e incluso adoptada por otros grupos de investigación.

Entre las posibles líneas de investigación con las que continuar este trabajo se podrían destacar:

1. La evaluación de un rango más amplio de fuerzas de compactación en los cambios en el volumen, el espacio vacío intergránulo, la consolidación del injerto y la integridad de las partículas; considerando también otros biomateriales particulados disponibles comercialmente para el aumento óseo.
2. El análisis de la respuesta a la compresión de los diversos biomateriales en diferente localización, tamaño y anatomía de defectos.
3. El estudio de la respuesta a la compresión de injertos particulados con tamaño de partícula grande (1,0-2,0 mm) ya que según el estudio realizado con el micro-CT la disminución en el volumen de la muestra y en los espacios intergránulo (inicialmente mayores) es mayor con esta morfología de injerto.
4. La evaluación del efecto de la compresión con un instrumento con una parte activa que coincida con la superficie del área aumentada para que la compresión sobre el injerto sea más homogénea.
5. El análisis de los resultados tras el empleo de diferentes fuerzas de compresión sobre defectos rellenos con el mismo volumen de biomaterial particulado previo a la compresión.
6. Estudiar el efecto de la fuerza de compresión con materiales con unos tamaños de partícula más homogéneos (rango de tamaño estrecho) en vez de un rango amplio, lo que nos permitiría estudiar mejor el efecto del tamaño de partícula.

7. El empleo de diferentes tiempos de cicatrización, puesto que podría haber una influencia en la angiogénesis tras la compresión de estos materiales en momentos más tempranos (2-4 semanas).
8. El estudio del efecto de la fuerza de compresión durante la ROG sobre biomateriales particulados que contengan diversos factores de crecimiento observando la neoformación ósea en la parte más distal del área aumentada.





## **6. CONCLUSIONES**



A la vista de los resultados de esta investigación y teniendo en consideración las limitaciones descritas, se puede concluir que:

1. El rango de presión del material de injerto particulado, obtenido en un estudio in vitro con la participación de 8 cirujanos experimentados, es de entre 9 y 152 gf y una media de  $53,50 \pm 24,98$  gf.
2. El instrumento compactador diseñado, trabajaba en los rangos de presión predefinidos de forma precisa y calibrada y puede ser tanto de utilidad en clínica y como en el campo de la investigación.
3. La microtomografía computerizada ha determinado que las diferentes fuerzas de compresión provocaban cambios en los espacios libres entre las partículas, el volumen total de las muestras y el porcentaje de muestra ocupada por partículas.
4. La aplicación de fuerzas de compresión en el rango de  $0,7 \text{ kg/cm}^2$  (82 gf) y  $1,6 \text{ kg/cm}^2$  (186 gf) ha permitido una consolidación adecuada de la hidroxiapatita bovina particulada (Cerabone<sup>®</sup> 0,5-1,0 mm) en un modelo de aumento de calota de conejo.
5. Con el empleo de ambas fuerzas de compresión (de  $0,7$  y  $1,6 \text{ kg/cm}^2$ ) no se han observado diferencias estadísticamente significativas en la neoformación ósea, ni en el número y área de vasos formados, ni en el contacto hueso-biomaterial.
6. Queda validado un modelo experimental que es de interés, ya que permite la creación de unos defectos reproducibles mediante un sencillo abordaje quirúrgico que junto con la colocación de un material de injerto óseo particulado de forma estandarizada permitirá generar una amplia gama de líneas de investigación futuras.

La hipótesis de partida, que consideraba que en la ROG las diferentes fuerzas de compresión sobre los injertos óseos particulados en el lecho óseo receptor influían en lo que respecta a la regeneración de un defecto óseo debe ser rechazada para las condiciones ensayadas: biomaterial: Cerabone<sup>®</sup> 0,5-1,0 mm y fuerzas:  $0,7$  y  $1,6 \text{ kg/cm}^2$ .



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Pérez-Pérez A, Galbany J, Romero A, Martínez LM, Estebaranz F, Pinilla B, et al. Origen y evolución de los dientes: de los cordados primitivos a los humanos modernos. *Rev Esp Antropol Física*. 2010;31:167-92.
2. White GS. Treatment of the edentulous patient. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2015;27(2):265-72.
3. Drago C, Carpentieri J. Treatment of maxillary jaws with dental implants: guidelines for treatment. *J Prosthodont*. 2011;20(5):336-47.
4. Martonffy AI. Oral health: dentures and dental implants. *FP Essent*. 2015;428:27-32.
5. Gaviria L, Salcido JP, Guda T, Ong JL. Current trends in dental implants. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2014;40(2):50-60.
6. Turkyilmaz I, Company AM, McGlumphy EA. Should edentulous patients be constrained to removable complete dentures? The use of dental implants to improve the quality of life for edentulous patients. *Gerodontology*. 2010;27(1):3-10.
7. Nickenig HJ, Wichmann M, Andreas SK, Eitner S. Oral health-related quality of life in partially edentulous patients: assessments before and after implant therapy. *J Craniomaxillofac Surg*. 2008;36(8):477-80.
8. American Academy of Implant Dentistry (AAID). Glossary of Terms. *The Journal of Implantology*. 2016.
9. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(Suppl 2):136-59.
10. Chou J, Hao J, Kuroda S, Ben-Nissan B, Milthopre B, Otsuka M. Bone regeneration of calvarial defect using marine calcareous-derived beta-tricalcium phosphate microspheres. *J Tissue Eng*. 2014;5:2041731414523441.
11. Charyeva O, Altynbekov K, Zhartybaev R, Sabdanaliev A. Long-term dental implant success and survival-a clinical study after an observation period up to 6 years. *Swed Dent J*. 2012;36(1):1-6.
12. Sanz-Sánchez I, Ortiz-Vigón A, Sanz-Martín I, Figuero E, Sanz M. Effectiveness of lateral bone augmentation on the alveolar crest dimension: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2015;94(Suppl 9):128-42.

13. Santagata M, Guariniello L, D'Andrea A, Tartaro G. A modified crestal ridge expansion technique for immediate placement of implants: a report of three cases. *J Oral Implantol.* 2008;34(6):319-24.
14. Nishioka RS, Kojima AN. Screw spreading: technical considerations and case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011;31(2):141-7.
15. Bosshardt DD, Schenk RK. Principios biológicos de la regeneración ósea. In: Buser D, editor. *20 años de Regeneración Ósea Guiada en Implantología Oral.* Barcelona: Editorial Quintessence S.L.; 2012. p.15-45.
16. Elian N, Jalbout Z, Ehrlich B, Classi A, Cho SC, Al-Kahtani F, et al. A two-stage full-arch ridge expansion technique: review of the literature and clinical guidelines. *Implant Dent.* 2008;17(1):16-23.
17. Fu JH, Wang HL. Horizontal bone augmentation: the decision tree. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011;31(4):429-36.
18. Kang T, Fien MJ, Gober D, Drennen CJ. A modified ridge Expansion technique in the maxilla. *Compend Contin Educ Dent.* 2012;33(4):250-60.
19. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol.* 1980;7(2):96-105.
20. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol.* 1982;9(3):257-65.
21. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988;81(5):672-6.
22. Jensen SS, Bosshardt DD, Buser D. Injertos óseos y materiales de sustitución ósea. In: Buser D, editor. *20 años de Regeneración Ósea Guiada en Implantología Oral.* Barcelona: Editorial Quintessence S.L.; 2012. p.71-96.
23. Wang HL, Boyapati L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent.* 2006;15(1):8-17.
24. Donos N, Mardas N, Chadha V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). *J Clin Periodontol.* 2008;35(Suppl 8):173-202.

25. Aloy-Prósper A, Maestre-Ferrin L, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diago M. Bone regeneration using particulate grafts: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2):210-4.
26. Hämmerle CH, Jung RE, Feloutzis A. A systematic review of the survival of implants in bone sites augmented with barrier membranes (guided bone regeneration) in partially edentulous patients. *J Clin Periodontol*. 2002;29(Suppl 3):226-33.
27. Moraschini V, Poubel LA, Ferreira VF, Barboza ES. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(3):377-88.
28. Freed LE, Guilak F, Guo XE, Gray ML, Tranquillo R, Holmes JW, et al. Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. *Tissue Eng*. 2006;12(12):3285-305.
29. Krauser JT, Schettritt A. Implant Site Development: Socket preservation. In: Sonick M, Hwang D, editors. *Implant Site Development*. Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.; 2012. p.121-35.
30. Lin S. Sinus augmentation with immediate implant insertion: a case report. *J Implant Adv Clin Dent*. 2013;5(10):11-6.
31. Villarreal PM, Fernández-Bustillo Á, Acero J, Arruti JA, Baladrón J, Bilbao A, et al. I Conferencia Nacional de Consenso sobre el Injerto Óseo del Seno Maxilar. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*. 2010;32(2):41-63.
32. Brugnami F, Then PR, Moroi H, Kabani S, Leone CW. GBR in human extraction sockets and ridge defects prior to implant placement: clinical results and histologic evidence of osteoblastic and osteoclastic activities in DFDBA. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1999;19(3):259-67.
33. Brugnami F, Mellonig JT. Treatment of a large periapical lesion with loss of labial cortical plate using GTR: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1999;19(3):243-9.
34. Romanos GE, Delgado-Ruiz RA, Gómez-Moreno G, López-López PJ, Mate Sanchez de Val JE, Calvo-Guirado JL. Role of mechanical compression on bone regeneration around a particulate bone graft material: an experimental study in rabbit calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29(6):612-9.

35. Gómez de Ferraris ME, Campos A. Periodoncio de inserción: Cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. In: Gómez de Ferraris ME, Campos A, editors. *Histología y embriología bucodental*. 2nd ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2002. p.339-83.
36. Rincón E, Ros A, Claramunt R, Arranz F. Caracterización mecánica del material óseo. *Tecnología y Desarrollo*. 2004;(2):1-27.
37. Rios HF, Giannobile WV. Principles of bone biology and regeneration. In: Sonick M, Hwang D, editors. *Implant Site Development*. Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.; 2012. p.1-13.
38. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(1):47-51.
39. Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE, editor. *Bone engineering*. Toronto: EM Squared Incorporated. 2000; p.1-14.
40. Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handbook*. 2nd ed. United States of America: CRC Press LLC; 2001. p.1-68.
41. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res*. 1993;8(Suppl 2):483-7.
42. Giannobile WV, Rios HF, Lang NP. El hueso como tejido. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editors. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 5th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009. p.86-98.
43. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*. 2000;21(4):393-411.
44. Riancho JA, Delgado-Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatol Clin*. 2011;7(Suppl 2):1-4.
45. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem*. 1994;55(3):287-99.
46. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:281-90.

47. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(3):171-80.
48. Kulkarni RN, Bakker AD, Gruber EV, Chae TD, Veldkamp JB, Klein-Nulend J, et al. MT1-MMP modulates the mechanosensitivity of osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(2):824-9.
49. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008;42(4):606-15.
50. Arboleya L, Castañeda S. Osteoclasts: Much more than bone remodelling cells. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2014;6(4):109-21.
51. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone.* 2015;80:14-8.
52. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell.* 2010;19(2):329-44.
53. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003;423(6937):332-6.
54. Bao CLM, Teo EY, Chong MSK, Liu Y, Choolani M, Chan JKY. Advances in Bone Tissue Engineering. In: Andrades JA, editor. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering.* London: IntechOpen;2013. p.599-614.
55. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone.* 2004;35(5):1003-12.
56. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res.* 2014;93(2):109-16.
57. Nahian A, Chauhan PR. Histology, Periosteum And Endosteum. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
58. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res.* 2019;37(1):35-50.
59. Delgado-Calle J, Riancho JA. Mecanobiología celular y molecular del tejido óseo. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2013;5(1):51-6.
60. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: Systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(3):233-45.

61. Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Sánchez-Gutiérrez JJ, Bascones-Martínez A. Mecanobiología de los huesos maxilares: II. Remodelación ósea. *Av Odontoestomatol*. 2008;24(2):177-86.
62. Ott SM. Sclerostin and Wnt signaling-the pathway to bone strength. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(12):6741-3.
63. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;159(1-2):7-13.
64. Hambli R, Rieger R. Physiologically based mathematical model of transduction of mechanobiological signals by osteocytes. *Biomech Model Mechanobiol*. 2012;11(1-2):83-93.
65. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015(1):421746.
66. Mikán JF, Oliveros WD. Osteoclastogénesis y enfermedades óseas. *Rev Med*. 2007;15(2):261-70.
67. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
68. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(2):151-7.
69. Sharif PS, Abdollahi M. The role of platelets in bone remodeling. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010;9(5):393-399.
70. Spiller KL, Anfang RR, Spiller KJ, Ng J, Nakazawa KR, Daulton JW, et al. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2014;35(15):4477-88.
71. Araújo M, Lindhe J. Reborde alveolar edéntulo. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editors. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 5th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009. p.50-68.
72. Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol* 2000. 2015;68(1):122-34.

73. 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.
74. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005;32(2):212-8.
75. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(4):313-23.
76. Chen ST, Wilson TG Jr, Hämmerle CH. Immediate or early placement of implants following tooth extraction: review of biologic basis, clinical procedures, and outcomes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19(Suppl):12-25.
77. Barone A, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. *J Periodontol*. 2008;79(8):1370-7.
78. Tan WL, Wong TL, Wong MC, Lang NP. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(Suppl 5):1-21.
79. Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2009;36(12):1048-58.
80. Iasella JM, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Drisko C, Bohra AA, et al. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol*. 2003;74(7):990-9.
81. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Klokkevold PR, Kenney EB, Dimitrijevic B, et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;90(5):581-6.
82. Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, Weinlaender M, Kenney EB, Dimitrijevic B, et al. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol*. 1998;69(9):1044-9.
83. Lekovic V, Kenney EB, Weinlaender M, Han T, Klokkevold P, Nedic M, et al. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. *J Periodontol*. 1997;68(6):563-70.

84. Hämmerle CH, Araújo MG, Simion M. Evidence-based knowledge on the biology and treatment of extraction sockets. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(Suppl 5):80-2.
85. Araújo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008;28(2):123-35.
86. Araújo MG, Silva JCC, Mendonça AF, Lindhe J. Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man: A randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):407-12.
87. Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(Suppl 5):22-38.
88. MacBeth N, Trullenque-Eriksson A, Donos N, Mardas N. Hard and soft tissue changes following alveolar ridge preservation: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(8):982-1004.
89. Willenbacher M, Al-Nawas B, Berres M, Kämmerer PW, Schiegnitz E. The effects of alveolar ridge preservation: A meta-analysis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18(6):1248-68.
90. Pagni G, Pellegrini G, Giannobile WV, Rasperini G. Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments. *Int J Dent.* 2012;2012:151030.
91. de Coster P, Browaeys H, De Bruyn H. Healing of extraction sockets filled with BoneCeramic<sup>®</sup> prior to implant placement: preliminary histological findings. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2011;13(1):34-45.
92. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol.* 2000;71(6):1015-23.
93. Araújo MG, Sukekava F, Wennström JL, Lindhe J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005;32(6):645-52.
94. Araújo MG, Wennström JL, Lindhe J. Modeling of the buccal and lingual bone walls of fresh extraction sites following implant installation. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(6):606-14.

95. Araújo MG, Sukekava F, Wennström JL, Lindhe J. Tissue modeling following implant placement in fresh extraction sockets. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(6):615-24.
96. Araújo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss® Collagen in the buccal gap at immediate implants: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(1):1-8.
97. Hämmerle CH, Jung RE. Procedimientos de aumentación del reborde alveolar. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T, editors. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica.* 5th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009. p.1083-98.
98. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22(Suppl):49-70.
99. Benic GI, Hämmerle CH. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000.* 2014;66(1):13-40.
100. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(Suppl):237-59.
101. Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T. Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(2):133-9.
102. Turri A, Elgali I, Vazirisani F, Johansson A, Emanuelsson L, Dahlin C, et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. *Biomaterials.* 2016;84:167-83.
103. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982;9(4):290-6.
104. Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *J Periodontol.* 1993;64(Suppl 11):1157-65.
105. Melcher AH, Dreyer CJ. Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. *J Bone Joint Surg Br.* 1962;44B(2):424-30.
106. Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am.* 1959;41A:1243-54.
107. Murray G, Holden R, Roschlau W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. *Am J Surg.* 1957;93(3):385-7.

108. Scantlebury T, Ambruster J. The development of guided regeneration: making the impossible possible and the unpredictable predictable. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12(Suppl 3):101-17.
109. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9(1):13-29.
110. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J.* 2014;8:56-65.
111. Greenstein G, Greenstein B, Cavallaro J, Tarnow D. The role of bone decortication in enhancing the results of guided bone regeneration: a literature review. *J Periodontol.* 2009;80(2):175-89.
112. Schmid J, Wallkamm B, Hämmerle CH, Gogolewski S, Lang NP. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration: A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(3):244-8.
113. Hämmerle CH, Schmid J, Olah AJ, Lang NP. A novel model system for the study of experimental guided bone formation in humans: Experimental formation of jaw bone in humans. *Clin Oral Implants Res.* 1996;7(1):38-47.
114. Khojasteh A, Kheiri L, Motamedian S, Khoshkam V. Guided bone regeneration for the reconstruction of alveolar bone defects. *Ann Maxillofac Surg.* 2017;7(2):263-77.
115. Wessing B, Lettner S, Zechner W. Guided bone regeneration with collagen membranes and particulate graft materials: A systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018;33(1):87-100.
116. Hwang D, Sonick M. Guided bone regeneration: Concepts and materials. In: Sonick M, Hwang D, editors. *Implant Site Development.* Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.; 2012. p.153-78.
117. Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 1990;1(1):22-32.
118. Chiapasco M, Abati S, Romeo E, Vogel G. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(4):278-88.

119. Artzi Z, Dayan D, Alpern Y, Nemcovsky CE. Vertical ridge augmentation using xenogenic material supported by a configured titanium mesh: clinicohistopathologic and histochemical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(3):440-6.
120. Feuille F, Knapp CI, Brunsvold MA, Mellonig JT. Clinical and histologic evaluation of bone-replacement grafts in the treatment of localized alveolar ridge defects. Part 1: Mineralized freeze-dried bone allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(1):29-35.
121. Proussaefs P, Lozada J, Kleinman A, Rohrer MD, McMillan PJ. The use of titanium mesh in conjunction with autogenous bone graft and inorganic bovine bone mineral (bio-oss) for localized alveolar ridge augmentation: a human study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(2):185-95.
122. Proussaefs P, Lozada J. The use of resorbable collagen membrane in conjunction with autogenous bone graft and inorganic bovine mineral for buccal/labial alveolar ridge augmentation: a pilot study. *J Prosthet Dent*. 2003;90(6):530-8.
123. Proussaefs P, Lozada J. Use of titanium mesh for staged localized alveolar ridge augmentation: clinical and histologic-histomorphometric evaluation. *J Oral Implantol*. 2006;32(5):237-47.
124. Steigmann M. Pericardium membrane and xenograft particulate grafting materials for horizontal alveolar ridge defects. *Implant Dent*. 2006;15(2):186-91.
125. Geurs NC, Korostoff JM, Vassilopoulos PJ, Kang TH, Jeffcoat M, Kellar R, et al. Clinical and histologic assessment of lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic long-term bioabsorbable membrane and an allograft. *J Periodontol*. 2008;79(7):1133-40.
126. Fontana F, Santoro F, Maiorana C, Iezzi G, Piattelli A, Simion M. Clinical and histologic evaluation of allogeneic bone matrix versus autogenous bone chips associated with titanium-reinforced e-PTFE membrane for vertical ridge augmentation: a prospective pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23(6):1003-12.
127. Pieri F, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Marchetti C. Alveolar ridge augmentation with titanium mesh and a combination of autogenous bone and anorganic bovine bone: a 2-year prospective study. *J Periodontol*. 2008;79(11):2093-103.
128. Hämmerle CH, Jung RE, Yaman D, Lang NP. Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(1):19-25.

129. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976;47(5):256-60.
130. Hardwick R, Scantlebury T, Sanchez R, Whitley N, Ambruster J. Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry.* Chicago: Editorial Quintessence S.L.;1994. p.101-36.
131. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci.* 2017;125(5):315-37.
132. Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen P. Barrier membranes: More than the barrier effect? *J Clin Periodontol.* 2019;46(Suppl 21):103-23.
133. Tinti C, Parma-Benfenati S, Polizzi G. Vertical ridge augmentation: what is the limit? *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1996;16(3):220-9.
134. Simion M, Jovanovic SA, Trisi P, Scarano A, Piattelli A. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998;18(1):8-23.
135. Bornstein MM, von Arx T, Bosshardt DD. Propiedades de las membranas de barrera. In: Buser D, editor. *20 años de Regeneración Ósea Guiada en Implantología Oral.* Barcelona: Editorial Quintessence S.L.; 2012. p.47-69.
136. Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12(6):844-52.
137. Garcia J, Dodge A, Luepke P, Wang HL, Kapila Y, Lin GH. Effect of membrane exposure on guided bone regeneration: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(3):328-38.
138. Piattelli A, Scarano A, Coraggio F, Matarasso S. Early tissue reactions to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit. *Biomaterials.* 1998;19(10):889-96.
139. Haney JM, Nilvéus RE, McMillan PJ, Wikesjö UM. Periodontal repair in dogs: expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes support wound stabilization and enhance bone regeneration. *J Periodontol.* 1993;64(9):883-90.

140. Simion M, Misitano U, Gionso L, Salvato A. Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with bone autografts: a comparative clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12(2):159-67.
141. Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16(3):355-66.
142. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(10):2445-61.
143. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005;36(Suppl 3):20-7.
144. Mellonig JT, Nevins M. Guided bone regeneration of bone defects associated with implants: an evidence-based outcome assessment. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1995;15(2):168-85.
145. Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res.* 2018;62(2):152-61.
146. Doi K, Kubo T, Makihara Y, Oue H, Morita K, Oki Y, et al. Osseointegration aspects of placed implant in bone reconstruction with newly developed block-type interconnected porous calcium hydroxyapatite. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(4):325-31.
147. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(4):498-506.
148. Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, et al. Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts: Release of growth factors from autografts. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;15(4):481-9.
149. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Av periodoncia implantol oral.* 2012;24(3):133-8.
150. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am.* 2010;54(1):55-71.

151. Zhang M, Powers RM Jr, Wolfenbarger L Jr. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol.* 1997;68(11):1085-92.
152. Cammack GV, Nevins M, Clem DS, Hatch JP, Mellonig JT. Histologic evaluation of mineralized and demineralized freeze-dried bone allograft for ridge and sinus augmentations. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2005;25(3):231-7.
153. Piattelli A, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials.* 1996;17(11):1127-31.
154. AlGhamdi AS, Shibly O, Ciancio SG. Osseous grafting part I: autografts and allografts for periodontal regeneration--a literature review. *J Int Acad Periodontol.* 2010;12(2):34-8.
155. Danesh-Sani SA, Engebretson SP, Janal MN. Histomorphometric results of different grafting materials and effect of healing time on bone maturation after sinus floor augmentation: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2017;52(3):301-12.
156. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL Jr, Dean DD, Cochran DL, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol.* 1998;69(4):470-8.
157. Gocke DJ. Tissue donor selection and safety. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;435:17-21.
158. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, de la Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol.* 1996;67(9):918-26.
159. Piecuch JF, Ponichtera A, Nikoukari H. Long-term evaluation of porous hydroxyapatite blocks for alveolar ridge augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1990;19(3):147-50.
160. Thorwarth M, Wehrhan F, Srour S, Schultze-Mosgau S, Felszeghy E, Bader RD, et al. Evaluation of substitutes for bone: comparison of microradiographic and histological assessments. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45(1):41-7.
161. 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.

162. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(6):835-40.
163. Jensen SS, Broggin N, Hjørting-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 Implants Res*. 2006;17(3):237-43.
164. Cho YR, Gosain AK. Biomaterials in craniofacial reconstruction. *Clin Plast Surg*. 2004;31(3):377-85.
165. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial?. *J Clin Periodontol*. 2019;46(Suppl 21):92-102.
166. Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontol* 2000. 1999;19(1):74-86.
167. Bouler JM, Pilet P, Gauthier O, Verron E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomater*. 2017;53:1-12.
168. Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hämmerle CH. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(2):188-95.
169. Park JC, Bae EB, Kim SE, Kim SY, Choi KH, Choi JW, et al. Effects of BMP-2 Delivery in Calcium Phosphate Bone Graft Materials with Different Compositions on Bone Regeneration. *Materials (Basel)*. 2016;9(11):954.
170. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(1):55-66.
171. Fugazzotto PA. GBR using bovine bone matrix and resorbable and nonresorbable membranes. Part 1: histologic results. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(4):361-9.
172. Trajkovski B, Jaunich M, Müller WD, Beuer F, Zafiroopoulos GG, Houshmand A. Hydrophilicity, Viscoelastic, and Physicochemical Properties Variations in Dental Bone Grafting Substitutes. *Materials (Basel)*. 2018;11(2):215.

173. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cell Mater.* 2013;26:120-32.
174. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res.* 1998;39(2):190-9.
175. Hannink G, Arts JJ. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration?. *Injury.* 2011;42(Suppl 2):22-5.
176. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474-91.
177. Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122(4):392-402.
178. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(6):485-502.
179. Du B, Gao Y, Deng Y, Zhao Y, Lai C, Guo Z, et al. Local delivery of rhVEGF165 through biocoated nHA/coral block grafts in critical-sized dog mandible defects: a histological study at the early stages of bone healing. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(4):4940-53.
180. Nguyen LH, Annabi N, Nikkhah M, Bae H, Binan L, Park S, et al. Vascularized bone tissue engineering: approaches for potential improvement. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012;18(5):363-82.
181. Paulo MJE, Dos Santos MA, Cimatti B, Gava NF, Riberto M, Engel EE. Osteointegration of porous absorbable bone substitutes: A systematic review of the literature. *Clinics (Sao Paulo).* 2017;72(7):449-53.
182. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26(4):433-41.
183. Harley BA, Kim HD, Zaman MH, Yannas IV, Lauffenburger DA, Gibson LJ. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophys J.* 2008;95(8):4013-24.
184. Salem AK, Stevens R, Pearson RG, Davies MC, Tendler SJ, Roberts CJ, et al. Interactions of 3T3 fibroblasts and endothelial cells with defined pore features. *J Biomed Mater Res.* 2002;61(2):212-17.

185. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech.* 2010;43(1):55-62.
186. Fierz FC, Beckmann F, Huser M, Irsen SH, Leukers B, White F, et al. The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials.* 2008;29(28):3799-806.
187. Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials.* 2007;28(9):1664-71.
188. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1970;4(3):433-56.
189. Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res.* 1971;5(6):161-229.
190. Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Gallur A, Descamps M, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10(2):111-20.
191. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials.* 2006;27(17):3230-7.
192. Zhang X, Tiainen H, Haugen HJ. Comparison of titanium dioxide scaffold with commercial bone graft materials through micro-finite element modelling in flow perfusion. *Med Biol Eng Comput.* 2019;57(1):311-24.
193. Bai F, Wang Z, Lu J, Liu J, Chen G, Lv R, et al. The correlation between the internal structure and vascularization of controllable porous bioceramic materials in vivo: a quantitative study. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(12):3791-3803.
194. Murakami Y, Honda Y, Anada T, Shimauchi H, Suzuki O. Comparative study on bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate with various granule sizes. *Acta Biomater.* 2010;6(4):1542-8.
195. Rolvien T, Barbeck M, Wenisch S, Amling M, Krause M. Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):2893.

196. Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(5):548-55.
197. Carneiro E, Garcia RB, Oliveira RC, Moraes FG, Menezes R, Letra A, et al. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. *J Appl Oral Sci.* 2005;13(2):157-62.
198. Malinin TI, Carpenter EM, Temple HT. Particulate bone allograft incorporation in regeneration of osseous defects; importance of particle sizes. *Open Orthop J.* 2007;1(1):19-24.
199. Kon K, Shiota M, Ozeki M, Yamashita Y, Kasugai S. Bone augmentation ability of autogenous bone graft particles with different sizes: a histological and micro-computed tomography study. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(11):1240-6.
200. Zhou X, Zhang Z, Li S, Bai Y, Xu H. Osteoconduction of different sizes of anorganic bone particles in a model of guided bone regeneration. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2011;49(1):37-41.
201. Chackartchi T, Iezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piattelli A, et al. Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(5):473-80.
202. Testori T, Wallace SS, Trisi P, Capelli M, Zuffetti F, Del Fabbro M. Effect of xenograft (ABBM) particle size on vital bone formation following maxillary sinus augmentation: a multicenter, randomized, controlled, clinical histomorphometric trial. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2013;33(4):467-75.
203. Klüppel LE, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. Bone repair is influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: a histologic and radiographic study in vivo. *J Craniofac Surg.* 2013;24(4):1074-7.
204. Kon K, Shiota M, Ozeki M, Kasugai S. The effect of graft bone particle size on bone augmentation in a rabbit cranial vertical augmentation model: a microcomputed tomography study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29(2):402-6.
205. dos Anjos TL, de Molon RS, Paim PR, Marcantonio E, Marcantonio E Jr, Faeda RS. Implant stability after sinus floor augmentation with deproteinized bovine bone mineral particles of different sizes: a prospective, randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016;45(12):1556-63.

206. Kheur MG, Kheur S, Lakha T, Jambhekar S, Le B, Jain V. Does Graft Particle Type and Size Affect Ridge Dimensional Changes After Alveolar Ridge Split Procedure?. *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;76(4):761-9.
207. de Molon RS, Magalhaes-Tunes FS, Semedo CV, Furlan RG, de Souza LGL, de Souza Faloni AP, et al. A randomized clinical trial evaluating maxillary sinus augmentation with different particle sizes of demineralized bovine bone mineral: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2019;48(6):810-23.
208. Liu Y, Chan JK, Teoh SH. Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(2):85-105.
209. Ben-Bassat H, Klein BY, Leichter I, Liebergall M, Segal D, Kahana F SS. HA-SAL2: Novel Bone Graft Substitute with Composition Mimicking Bone Mineral. In: Wise DL, Trantolo DJ, Lewandrowski K, Gresser JD, Cattaneo MV, Yaszemski MJ, editors. *Biomaterials Engineering and Devices: Human Applications.* 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 2003. p.155-69.
210. Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem.* 1994;56(3):340-7.
211. Spiller KL, Nassiri S, Witherel CE, Anfang RR, Ng J, Nakazawa KR, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials.* 2015;37:194-207.
212. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20(2):86-100.
213. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):1-18.
214. Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, et al. Influence of  $\beta$ -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater.* 2010;6(12):4476-87.
215. Tomlinson RE, Silva MJ. Skeletal Blood Flow in Bone Repair and Maintenance. *Bone Res.* 2013;1(4):311-22.
216. Stegen S, van Gestel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone.* 2015;70:19-27.

217. Sivaraj KK, Adams RH. Blood vessel formation and function in bone. *Development*. 2016;143(15):2706-15.
218. Hämmerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(2):167-74.
219. Udagawa A, Sato S, Hasuike A, Kishida M, Arai Y, Ito K. Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(7):787-92.
220. Grosso A, Burger MG, Lunger A, Schaefer DJ, Banfi A, Di Maggio N. It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5:68.
221. Portal-Núñez S, Lozano D, Esbrit P. Role of angiogenesis on bone formation. *Histol Histopathol*. 2012;27(5):559-66.
222. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008;15:100-14.
223. Wernike E, Montjovent MO, Liu Y, Wismeijer D, Hunziker EB, Siebenrock KA, et al. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. *Eur Cell Mater*. 2010;19:30-40.
224. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;355(Suppl):82-9.
225. Zhou Y, Shi M, Jones JR, Chen Z, Chang J, Wu C, et al. Strategies to direct vascularisation using mesoporous bioactive glass-based biomaterials for bone regeneration. *Int Mater Rev*. 2017;62(7):392-414.
226. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014;507(7492):323-8.
227. Wu S, Xu X, Sun J, Zhang Y, Shi J, Xu T. Low-Intensity pulsed ultrasound accelerates traumatic vertebral fracture healing by coupling proliferation of type H microvessels. *J Ultrasound Med*. 2018;37(7):1733-42.
228. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016;91:30-8.

229. Xia L, Yin Z, Mao L, Wang X, Liu J, Jiang X, et al. Akermanite bioceramics promote osteogenesis, angiogenesis and suppress osteoclastogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Sci Rep.* 2016;25(6):22005.
230. Esposito M, Buti J, Barausse C, Gasparro R, Sammartino G, Felice P. Short implants versus longer implants in vertically augmented atrophic mandibles: A systematic review of randomised controlled trials with a 5-year post-loading follow-up. *Int J Oral Implantol (Berl).* 2019;12(3):267-80.
231. Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2001;72(4):512-6.
232. Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994;14(2):166-80.
233. Seibert J, Nyman S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *J Periodontol.* 1990;61(3):157-65.
234. Wikesjö UM, Nilvéus RE, Selvig KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol.* 1992;63(3):158-65.
235. Dahlin C, Simion M, Nanmark U, Sennerby L. Histological morphology of the e-PTFE/tissue interface in humans subjected to guided bone regeneration in conjunction with oral implant treatment. *Clin Oral Implants Res.* 1998;9(2):100-6.
236. Stetzer K, Cooper G, Gassner R, Kapucu R, Mundell R, Mooney MP. Effects of fixation type and guided tissue regeneration on maxillary osteotomy healing in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(4):427-37.
237. Boerckel JD, Uhrig BA, Willett NJ, Huebsch N, Guldberg RE. Mechanical regulation of vascular growth and tissue regeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(37):674-80.
238. Ferretti C, Muthray E, Rikhotso E, Reyneke J, Ripamonti U. Reconstruction of 56 mandibular defects with autologous compressed particulate corticocancellous bone grafts. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2016;54(3):322-6.
239. Delgado-Ruiz R, Romanos GE, Alexandre Gerhke S, Gomez-Moreno G, Maté-Sánchez de Val JE, Calvo-Guirado JL. Biological effects of compressive forces exerted on particulate bone grafts during socket preservation: animal study. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(7):792-801.

240. Cho IW, Park JC, Shin HS. A comparison of different compressive forces on graft materials during alveolar ridge preservation. *J Periodontal Implant Sci.* 2017;47(1):51-63.
241. Lundgren AK, Lundgren D, Hämmerle CH, Nyman S, Sennerby L. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(2):99-106.
242. Slotte C, Lundgren D. Impact of cortical perforations of contiguous donor bone in a guided bone augmentation procedure: an experimental study in the rabbit skull. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2002;4(1):1-10.
243. Lundgren AK, Lundgren D, Wennerberg A, Hämmerle CH, Nyman S. Influence of surface roughness of barrier walls on guided bone augmentation: experimental study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 1999;1(1):41-8.
244. Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogenic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(6):795-806.
245. Thoma DS, Kruse A, Ghayor C, Jung RE, Weber FE. Bone augmentation using a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute materials with and without recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(5):592-8.
246. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A, et al. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials.* 2010;31(13):3527-35.
247. Marques JM, Viegas C, Dias MI, Zagalo C, Gomes P, Fernandes MH, et al. Modified model of sub-critical size cranial defect in the rabbit. *Int. J. Morphol.* 2010;28(2):525-8.
248. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother.* 2010;1(2):94-9.
249. Brizuela-Velasco A, Jiménez-Garrudo A, Viteri-Agustín I, Chávarri-Prado D, Pérez-Pevida E, Diéguez-Pereira M, et al. Design of a precision compactor for use in guided bone regeneration in the area of oral surgery. *Dyna.* 2019 Jan 1;94(1):53-8.
250. Yang S, Lan L, Miron RJ, Wei L, Zhang M, Zhang Y. Variability in Particle Degradation of Four Commonly Employed Dental Bone Grafts. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015;17(5):996-1003.

251. Bashoor-Zadeh M, Baroud G, Bohner M. Effect of subvoxel processes on non-destructive characterization of  $\beta$ -tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Acta Biomater.* 2011;7(11):4045-56.
252. Hiu-Yan Y, Ling Q, Kwong-Man L, Ming Z, Kwok-Sui L, Chun-Yiu CJ. Novel approach for quantification of porosity for biomaterial implants using microcomputed tomography (microCT). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;75(2):234-42.
253. Jones AC, Arns CH, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Sheppard AP, Knackstedt MA. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials.* 2009;30(7):1440-51.
254. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007;13:1-10.
255. Stübinger S, Dard M. The rabbit as experimental model for research in implant dentistry and related tissue regeneration. *J Invest Surg.* 2013;26(5):266-82.
256. Schimandle JH, Boden SD. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 1994;19(17):1998-2006.
257. International Organization for Standardization - ISO 10993-6:1994 - Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation. Geneva: ISO;1994.
258. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat.* 2015;3(3):95-104.
259. Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9(1):111-8.
260. Ye JH, Xu YJ, Gao J, Yan SG, Zhao J, Tu Q, et al. Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2-modified iPSCs. *Biomaterials.* 2011;32(22):5065-76.
261. Tielinen L, Manninen M, Puolakkainen P, Kellomäki M, Törmälä P, Rich J, et al. Inability of transforming growth factor-beta 1, combined with a bioabsorbable polymer paste, to promote healing of bone defects in the rat distal femur. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2001;121(4):191-6.
262. Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Betz O, Merkle HP, et al. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone.* 2007;41(2):247-55.

263. Vignoletti F, Abrahamsson I. Quality of reporting of experimental research in implant dentistry. Critical aspects in design, outcome assessment and model validation. *J Clin Periodontol.* 2012;39(Suppl 12):6-27.
264. Sawada K, Nakahara K, Haga-Tsujimura M, Iizuka T, Fujioka-Kobayashi M, Igarashi K, et al. Comparison of three block bone substitutes for bone regeneration: long-term observation in the beagle dog. *Odontology.* 2018;106(4):398-407.
265. Johnson TB, Siderits B, Nye S, Jeong YH, Han SH, Rhyu IC, et al. Effect of guided bone regeneration on bone quality surrounding dental implants. *J Biomech.* 2018;80:166-70.
266. Pérez-Sayáns M, Lorenzo-Pouso AI, Galindo-Moreno P, Muñoz-Guzón F, González-Cantalapiedra A, López-Peña M, et al. Evaluation of a new tricalcium phosphate for guided bone regeneration: an experimental study in the beagle dog. *Odontology.* 2019;107(2):209-18.
267. Won JY, Park CY, Bae JH, Ahn G, Kim C, Lim DH, et al. Evaluation of 3D printed PCL/PLGA/ $\beta$ -TCP versus collagen membranes for guided bone regeneration in a beagle implant model. *Biomed Mater.* 2016;11(5):055013.
268. Seo GY, Thoma DS, Jung UW, Lee JS. Increasing the tissue thickness at implant sites using guided bone regeneration and an additional collagen matrix: Histologic observations in beagle dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019;107(3):741-9.
269. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng.* 1998;8(1):1-9.
270. Kuhn JL, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Matthews LS. The limitations of canine trabecular bone as a model for human: a biomechanical study. *J Biomech.* 1989;22(2):95-107.
271. Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1626-33.
272. Guven G, Gultekin BA, Guven GS, Guzel E, Furat S, Ersanli S. Histologic and Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration Between Bone Morphogenetic Protein-2 and Platelet-Derived Growth Factor-BB in Experimental Groups. *J Craniofac Surg.* 2016;27(3):805-9.
273. Susin C, Fiorini T, Lee J, de Freitas RM, Chiu HC, Prasad HS, et al. Sinus augmentation using a mini-pig model: Effect of ceramic and allogeneic bone biomaterials. *J Clin Periodontol.* 2017;44(10):1059-66.

274. Busenlechner D, Tangl S, Mair B, Fugger G, Gruber R, Redl H, et al. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. *Biomaterials*. 2008;29(22):3195-200.
275. Kanter B, Vikman A, Brückner T, Schamel M, Gbureck U, Ignatius A. Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model. *Acta Biomater*. 2018;69:352-61.
276. Maissen O, Eckhardt C, Gogolewski S, Glatt M, Arvinte T, Steiner A, et al. Mechanical and radiological assessment of the influence of rhTGFbeta-3 on bone regeneration in a segmental defect in the ovine tibia: pilot study. *J Orthop Res*. 2006;24(8):1670-8.
277. Kobayashi H, Turner AS, Seim HB 3rd, Kawamoto T, Bauer TW. Evaluation of a silica-containing bone graft substitute in a vertebral defect model. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92(2):596-603.
278. Dias GJ, Mahoney P, Hung NA, Sharma LA, Kalita P, Smith RA, et al. Osteoconduction in keratin-hydroxyapatite composite bone-graft substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(7):2034-44.
279. Li JJ, Dunstan CR, Entezari A, Li Q, Steck R, Saifzadeh S, et al. A novel bone substitute with high bioactivity, strength, and porosity for repairing large and load-bearing bone defects. *Adv Healthc Mater*. 2019;8(8):1801298.
280. Li D, Deng L, Xie X, Yang Z, Kang P. Evaluation of the osteogenesis and angiogenesis effects of erythropoietin and the efficacy of deproteinized bovine bone/recombinant human erythropoietin scaffold on bone defect repair. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(6):101.
281. Li D, Deng L, Yang Z, Xie X, Kang P, Tan Z. Antigen-free bovine cancellous bone loaded with recombinant human bone morphogenetic protein-2 for the repair of tibial bone defects in goat model. *J Biomater Appl*. 2016;30(9):1322-33.
282. Guo H, Wang C, Wang J, He Y. Lithium-incorporated deproteinized bovine bone substitute improves osteogenesis in critical-sized bone defect repair. *J Biomater Appl*. 2018;32(10):1421-34.
283. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(4):356-62.

284. Stadlinger B, Pourmand P, Locher MC, Schulz MC. Systematic review of animal models for the study of implant integration, assessing the influence of material, surface and design. *J Clin Periodontol.* 2012;39(Suppl 12):28-36.
285. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998;18:118-23.
286. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol.* 1988;255(4):416-21.
287. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):123-45.
288. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(8):915-30.
289. Ikeno M, Hibi H, Kinoshita K, Hattori H, Ueda M. Effects of the permeability of shields with autologous bone grafts on bone augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(6):386-92.
290. Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85(1):206-17.
291. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;205:299-308.
292. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990;1(1):60-8.
293. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 1980;38(3):176-80.
294. Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg.* 2000;106(2):360-72.
295. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(6):1685-92.

296. Delgado-Ruiz RA, Calvo Guirado JL, Romanos GE. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(6):620-34.
297. Borie E, Fuentes R, Del Sol M, Oporto G, Engelke W. The influence of FDBA and autogenous bone particles on regeneration of calvaria defects in the rabbit: a pilot study. *Ann Anat.* 2011;193(5):412-7.
298. Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci.* 2010;40(4):180-7.
299. Chakar C, Soffer E, Cohen N, Petite H, Naaman N, Anagnostou F. Vertical bone regeneration with deproteinised bovine bone mineral or biphasic calcium phosphate in the rabbit calvarium: effect of autologous platelet lysate. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(1):5339.
300. Jung RE, Hämmerle CH, Kokovic V, Weber FE. Bone regeneration using a synthetic matrix containing a parathyroid hormone peptide combined with a grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007;22(2):258-66.
301. Polo CI, Lima JL, De Lucca L, Piacezzi CB, Naclério-Homem Mda G, Arana-Chavez VE, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2 associated with a variety of bone substitutes on vertical guided bone regeneration in rabbit calvarium. *J Periodontol.* 2013;84(3):360-70.
302. Ikeno M, Hibi H, Kinoshita K, Hattori H, Ueda M. Effects of self-assembling peptide hydrogel scaffold on bone regeneration with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(5):283-9.
303. Guo Z, Zhou L, Rong M, Ding J, Zhu A, Li S, et al. Bone augmentation in a titanium cap with a porous surface modified by microarc oxidation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(3):767-73.
304. Majzoub Z, Berengo M, Giardino R, Aldini NN, Cordioli G. Role of intramarrow penetration in osseous repair: a pilot study in the rabbit calvaria. *J Periodontol.* 1999;70(12):1501-10.
305. Fukuyama T, Sato S, Fukase Y, Ito K. Effects of alpha-DT cement with hydroxypropyl cellulose on bone augmentation within a titanium cap in the rabbit calvarium. *Dent Mater J.* 2010;29(2):160-6.

306. Min S, Sato S, Saito M, Ebihara H, Arai Y, Ito K. Micro-computerized tomography analysis: dynamics of bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(6):892-5.
307. Yamada Y, Tamura T, Hariu K, Asano Y, Sato S, Ito K. Angiogenesis in newly augmented bone observed in rabbit calvarium using a titanium cap. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(10):1003-9.
308. Yamada Y, Nanba K, Ito K. Effects of occlusiveness of a titanium cap on bone generation beyond the skeletal envelope in the rabbit calvarium. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(4):455-63.
309. Murai M, Sato S, Fukase Y, Yamada Y, Komiyama K, Ito K. Effects of different sizes of beta-tricalcium phosphate particles on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Dent Mater J.* 2006;25(1):87-96.
310. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol.* 2006;33(12):922-8.
311. Torres J, Tamimi FM, Tresguerres IF, Alkhraisat MH, Khraisat A, Lopez-Cabarcos E, et al. Effect of solely applied platelet-rich plasma on osseous regeneration compared to Bio-Oss: a morphometric and densitometric study on rabbit calvaria. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2008;10(2):106-12.
312. de Mello e Oliveira R, Pelegriane AA, Aloise AC, Ferreira LM. Xenograft impregnated with bone marrow mononuclear fraction for appositional bone regeneration in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29(4):962-8.
313. Coelho de Faria AB, Chiantia FB, Teixeira ML, Aloise AC, Pelegriane AA. Comparative Study Between Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and from Adipose Tissue, Associated with Xenograft, in Appositional Reconstructions: Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2016;31(6):155-61.
314. Min S, Sato S, Murai M, Okuno K, Fujisaki Y, Yamada Y, et al. Effects of marrow penetration on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *J Periodontol.* 2007;78(10):1978-84.
315. Quarto N, Wan DC, Kwan MD, Panetta NJ, Li S, Longaker MT. Origin matters: differences in embryonic tissue origin and Wnt signaling determine the osteogenic potential and healing capacity of frontal and parietal calvarial bones. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1680-94.

316. Skogh AC, Kihlström L, Neovius E, Persson C, Beckman MO, Engstrand T. Variation in calvarial bone healing capacity: a clinical study on the effects of BMP-2-hydrogel or bone autograft treatments at different cranial locations. *J Craniofac Surg.* 2013;24(2):339-43.
317. Pelegrine AA, Aloise AC, Zimmermann A, de Mello e Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(5):567-72.
318. Takauti CA, Futema F, Brito Junior RB, Abrahão AC, Costa C, Queiroz CS. Assessment of bone healing in rabbit calvaria grafted with three different biomaterials. *Braz Dent J.* 2014;25(5):379-84.
319. Oporto V GH, Fuentes R, Borie E, Del Sol M, Orsi IA, Engelke W. Radiographical and clinical evaluation of critical size defects in rabbit calvaria filled with allograft and autograft: a pilot study. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(7):1669-75.
320. Lundgren AK, Lundgren D, Sennerby L, Taylor A, Gottlow J, Nyman S. Augmentation of skull bone using a bioresorbable barrier supported by autologous bone grafts. An intra-individual study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(2):90-5.
321. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998;9(4):310-6.
322. Schlegel KA, Lang FJ, Donath K, Kulow JT, Wiltfang J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(1):7-13.
323. Yamada Y, Sato S, Yagi H, Ujiie H, Ezawa S, Ito K. Correlation in the densities of augmented and existing bone in guided bone augmentation. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(7):837-45.
324. Lundgren D, Lundgren AK, Sennerby L, Nyman S. Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1995;6(2):67-72.
325. Schmid J, Hämmerle CH, Olah AJ, Lang NP. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1994;5(3):125-30.

326. Slotte C, Lundgren D, Sennerby L. Bone morphology and vascularization of untreated and guided bone augmentation-treated rabbit calvaria: evaluation of an augmentation model. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(2):228-35.
327. Fügl A, Gasser H, Watzak G, Bucher A, Feierfeil J, Jürgens G, et al. S-nitroso albumin enhances bone formation in a rabbit calvaria model. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(3):381-6.
328. Murai M, Sato S, Koshi R, Yokoyama K, Ikeda K, Narukawa M, et al. Effects of the enamel matrix derivative and beta-tricalcium phosphate on bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *J Oral Sci.* 2005;47(4):209-17.
329. Okazaki K, Shimizu Y, Xu H, Ooya K. Blood-filled spaces with and without deproteinized bone grafts in guided bone regeneration. A histomorphometric study of the rabbit skull using non-resorbable membrane. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(2):236-43.
330. Tamura T, Fukase Y, Goke E, Yamada Y, Sato S, Nishiyama M, et al. Three-dimensional evaluation for augmented bone using guided bone regeneration. *J Periodontal Res.* 2005;40(3):269-76.
331. Hämmerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 1998;9(3):151-62.
332. Beltrán V, Engelke W, Dias FJ, Leiva C, Fuentes R, Borie E. Occlusive barriers in combination with particulate Bio-Oss® graft: a pilot study on rabbit calvaria. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(7):1714-20.
333. Jahangiri L, Hessamfar R, Ricci JL. Partial generation of periodontal ligament on endosseous dental implants in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(4):396-401.
334. Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Moreno-López LA, Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10(Suppl 1):74-87.
335. Jensen LN, Jensen JS, Gotfredsen K. A method for histological preparation of undecalcified bone sections containing acrylic bone cement. *Biotech Histochem.* 1991;1(2):82-6.
336. Maréchal M, Luyten F, Nijs J, Postnov A, Schepers E, van Steenberghe D. Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(6):708-14.

337. Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Guldberg RE. Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(1):302-10.
338. Jing XL, Farberg AS, Monson LA, Donneys A, Tchanque-Fossuo CN, Buchman SR. Radiomorphometric quantitative analysis of vasculature utilizing micro-computed tomography and vessel perfusion in the murine mandible. *Craniofac Trauma Reconstr.* 2012;5(4):223-30.
339. Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone.* 1998;23(1):59-66.
340. Matsumoto T, Goto D, Sato S. Subtraction micro-computed tomography of angiogenesis and osteogenesis during bone repair using synchrotron radiation with a novel contrast agent. *Lab Invest.* 2013;93(9):1054-63.
341. Young S, Kretlow JD, Nguyen C, Bashoura AG, Baggett LS, Jansen JA, et al. Microcomputed tomography characterization of neovascularization in bone tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(3):295-306.
342. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone.* 2008;43(5):931-40.
343. Huang C, Ness VP, Yang X, Chen H, Luo J, Brown EB, et al. Spatiotemporal Analyses of Osteogenesis and Angiogenesis via Intravital Imaging in Cranial Bone Defect Repair. *J Bone Miner Res.* 2015;30(7):1217-30.
344. Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jesion G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res.* 1990;8(6):833-42.
345. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(4):385-95.
346. Stephan EB, Jiang D, Lynch S, Bush P, Dziak R. Anorganic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. *J Periodontol.* 1999;70(4):364-9.

347. Lambert F, Léonard A, Drion P, Sourice S, Pilet P, Rompen E. The effect of collagenated space filling materials in sinus bone augmentation: a study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(5):505-11.
348. Alayan J, Vaquette C, Farah C, Ivanovski S. A histomorphometric assessment of collagen-stabilized anorganic bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation - a prospective clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(7):850-8.
349. Alayan J, Ivanovski S. A prospective controlled trial comparing xenograft/autogenous bone and collagen-stabilized xenograft for maxillary sinus augmentation-Complications, patient-reported outcomes and volumetric analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018;29(2):248-62.
350. Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(3):217-29.
351. Amaral M, Lopes MA, Silva RF, Santos JD. Densification route and mechanical properties of Si3N4-bioglass biocomposites. *Biomaterials.* 2002;23(3):857-62.
352. Murphy CM, Matsiko A, Haugh MG, Gleeson JP, O'Brien FJ. Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;11:53-62.
353. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 2006;126(4):677-89.
354. Wikesjö UM, Nilvéus R. Periodontal repair in dogs: effect of wound stabilization on healing. *J Periodontol.* 1990;61(12):719-24.
355. Goodman SB. The effects of micromotion and particulate materials on tissue differentiation. Bone chamber studies in rabbits. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1994;258:1-43.
356. Gutta R, Baker RA, Bartolucci AA, Louis PJ. Barrier membranes used for ridge augmentation: is there an optimal pore size?. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(6):1218-25.
357. Viteri-Agustín I, Brizuela-Velasco A, Lou-Bonafonte JM, Jiménez-Garrudo A, Chávarri-Prado D, Pérez-Pevida E, et al. The Impact of Compaction Force on Graft Consolidation in a Guided Bone Regeneration Model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2020;35(5):917-23.

358. Walschot LH, Schreurs BW, Verdonschot N, Buma P. The effect of impaction and a bioceramic coating on bone ingrowth in porous titanium particles. *Acta Orthop.* 2011;82(3):372-7.
359. Kuchler U, Keibl C, Fügl A, Schwarze UY, Tangl S, Agis H, et al. Dimethyloxalyglycine lyophilized onto bone substitutes increase vessel area in rat calvarial defects. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(5):485-91.
360. Sivan U, De Angelis J, Kusumbe AP. Role of angiocrine signals in bone development, homeostasis and disease. *Open Biol.* 2019;9(10):190144.
361. Berberi A, Samarani A, Nader N, Noujeim Z, Dagher M, Kanj W, et al. Physicochemical characteristics of bone substitutes used in oral surgery in comparison to autogenous bone. *Biomed Res Int.* 2014;2014:320790.
362. Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth to predict probing attachment loss. 5 years of observation following nonsurgical periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 1990;17(2):102-7.
363. Claffey N, Nylund K, Kiger R, Garrett S, Egelberg J. Diagnostic predictability of scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth for probing attachment loss. 3 1/2 years of observation following initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 1990;17(2):108-14.
364. Grossi SG, Dunford RG, Ho A, Koch G, Machtei EE, Genco RJ. Sources of error for periodontal probing measurements. *J Periodontal Res.* 1996;31(5):330-6.
365. Jeffcoat MK, Jeffcoat RL, Jens SC, Captain K. A new periodontal probe with automated cemento-enamel junction detection. *J Clin Periodontol.* 1986;13(4):276-80.
366. McCulloch CA, Birek P, Hardy V. Comparison of gingival attachment level measurements with an automated periodontal probe and a pressure-sensitive probe. *J Periodontal Res.* 1987;22(5):348-52.
367. Pascual JA, Lázaro PJ, Herrero M. Sondas electrónicas en periodoncia. *Periodoncia.* 2003;13(3):197-210.
368. Isaksson S, Alberius P, Klinge B, Jönsson J. Contribution of autogeneic membranous bone chips and bone paste to healing of rabbit skull defects. *Scand J Dent Res.* 1992;100(5):274-8.



## **8. ABREVIATURAS**



ABBM: Injerto óseo bovino inorgánico (Anorganic Bovine Bone Matrix)

BBC: Porcentaje de contacto hueso neoformado-biomaterial (Bone-Biomaterial Contact)

BMP-2: Proteína morfogenética ósea 2

BMP-4: Proteína morfogenética ósea 4

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas

BV: Vasos sanguíneos

BVA: Área de los vasos sanguíneos

C-FMS: Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos

CATK: Catepsina K

CDS: Defecto de tamaño crítico

CSF: Factor estimulador de colonias

daN/mm: decanewton/milímetro

DFDBA: Aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado (Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft)

Dkk-1: Proteína extracelular Dickkopf 1

Dsh: proteína Dishevelled

e-PTFE: Politetrafluoroetileno expandido

FDBA: Aloinjerto óseo liofilizado (Freeze-Dried Bone Allograft)

FGFs: Factores de crecimiento fibroblástico

gf: gramos-fuerza

GSK-3 $\beta$ : Glucógeno sintasa quinasa 3 beta

HA: Hidroxiapatita

HIF-1 $\alpha$ : Factor de transcripción inducible por hipoxia-1

IGF-I: Factor de crecimiento derivado de Insulina tipo 1

IGF-II: Factor de crecimiento derivado de Insulina tipo 2

IGFs: Factores de crecimiento derivados de insulina

IL-1:interleuquina 1

IL-11: interleuquina 11

IL-6: interleuquina 6

INF- $\gamma$ : Interferón-gamma

ISQ: Cuota de estabilidad de implante

Kg/cm<sup>2</sup>: Kilogramos/centímetro cuadrado

kV: kilovoltios

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MMP: Metaloproteinasas de la matriz  
NBF: Neoformación ósea.  
NO: óxido nítrico  
OBs: Osteoblastos  
OCs: Osteoclastos  
OPG: Osteoprotegerina  
Pa: Pascales  
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandina 2  
PGEs: prostaglandinas  
PTFE: Politetrafluoroetileno  
RANK: Receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B  
RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B  
RAP: Fenómeno de aceleración regional  
RER: Retículo endoplasmático rugoso  
rhBMP-2: Proteína morfogenética ósea recombinante humana-2  
ROG: Regeneración ósea guiada  
ROI: Región de interés (Region of interest)  
RTG: regeneración tisular guiada  
TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante Beta  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
TNF: Factor de necrosis tumoral  
TNFR: receptor para el factor de necrosis tumoral  
TRAF-6: proteína asociada al receptor del factor de necrosis tumoral-6  
TRAP: Fosfatasa ácida tartrato resistente  
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular  
vWF: Factor de von Willebrand  
 $\beta$ -TCP : Beta-fosfato tricálcico





## **9. ANEXOS**



## **9.1. INFORME DE CALIBRACIÓN POR EMPRESA INDEPENDIENTE**





# CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

Certificate of Calibration

Número 116191

Number

Página 1 de 8 páginas

Page of pages



AC6 Metrología S.L.

Polígono Comarca I, Edificio Pasarela

31160 Orkoien (Navarra)

Tel +349 948 355 300

[info@ac6m.com](mailto:info@ac6m.com) - [www.ac6m.com](http://www.ac6m.com)

C.I.F. B31795867

**OBJETO** Dinamómetro  
*Description* Dynamometer

**MARCA** DYNOSS  
*Manufacturer*

**MODELO** S/M  
*Model*

**IDENTIFICACIÓN (CÓDIGO)** S/N (AC00084344)  
*Identification (Code)*

**SOLICITANTE** GAMEDENT S.L.P  
*Applicant* C/ MINA SAN LUIS 12, 8°C  
4803 BILBAO (BIZKAIA)

**FECHA/S DE CALIBRACIÓN** 2017-06-30  
*Date/s of calibration*

**Fecha de emisión** 2017-06-30  
*Issue Date*

**Signatario/s autorizado/s**  
*Authorized signatory/ies*

Este documento se encuentra firmado electrónicamente. Toda reproducción en papel se considerará copia.  
*This document has been signed electronically. Any paper reproduction will be considered a copy.*

Responsable de Laboratorio  
*Head of Laboratory*

Este certificado se expide de acuerdo a las especificaciones de calidad recogidas en el Sistema de Calidad de AC6 Metrología y expresa fielmente el resultado de las medidas realizadas. Los resultados obtenidos en este informe se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones. El laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados.

*This certificate is issued in accordance with the specifications contained in the Quality System of AC6 Metrología and shows accurately the results of the measurements that have been carried out.*

*The results contained in this report are subjected to the moment and the conditions in which the measurements were made. The laboratory which issues this certificate, is not responsible for the damage that can be produced, due to improper use of the instruments that have been calibrated.*

## DESCRIPCIÓN DEL INSTRUMENTO

### Description of the instrument

Dinamómetro

*Dynamometer*

Fondo de Escala: **180 gf**

*Full Scale:*

Resolución: **0,01 gf**

*Resolution:*

## PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN

### Calibration procedure

La calibración se ha realizado efectuándose tres series de medida con valores de fuerza crecientes a compresión mediante comparación con transductor patrón, según el método de calibración interno MC.MF01/H.

*Calibration has been done making three measurement series with increasing compression force values by comparison using standard transducer, according to the internal method MC.MF01/H.*

Para realizar la calibración se ha fijado el mensurando entre el inicio de la marca y el final de la misma en cada una de las marcas.

*To perform the calibration set the measurand between the beginning of the brand and the final at each of the marks.*

La calibración se ha realizado sólo con un muelle, con otro muelle y el tope A, con ese mismo muelle y los topes A+B y con ese mismo muelle y los topes A+B+C..

*Calibration has been done only with a spring, with another spring and stop A, with that same spring and stops A + B and with that same spring and tops A+B+C..*

Se ha constatado que la variación entre el inicio de la marca y el final de la misma es de aproximadamente 7 g..

*It has found that the variation between the beginning of the mark and the end of the same is approximately 7 g..*

## ELEMENTOS EMPLEADOS

### Reference standards used

Transductor de fuerza marca HBM, modelo Z 30, nº 091530043, código MF01/08, junto con puente de medida marca HBM, modelo DK38-D20, nº 39636, código MF03/01, de clase 00 desde 10 N, certificado nº CEM 161172008 y fecha de validez del mismo hasta el 2018-07-11.

*Force Transducer HBM, model Z 30, serial nº 091530043, code MF01/08, together with measurement bridge HBM, model DK38-D20, serial nº 39636, code MF03/01, class 00 from 10 N, certificate nº CEM 161172008 valid until 2018-07-11.*

Termohigrómetro digital marca S/M, modelo S/M, nº de serie S/N, código MT62/08

*Digital thermohygrometer code MT62/08*

## TRAZABILIDAD

### Traceability

Los patrones e instrumentos empleados en la calibración tienen garantizada su trazabilidad a través de los Laboratorios reconocidos por ENAC u otra entidad de EA (European cooperation for Accreditation).

*The traceability of the reference standards used in the calibration is guaranteed via the ENAC laboratory accreditation and accredited calibrations through ENAC or other EA (European cooperation for Accreditation) entities.*

## CONDICIONES DE CALIBRACIÓN

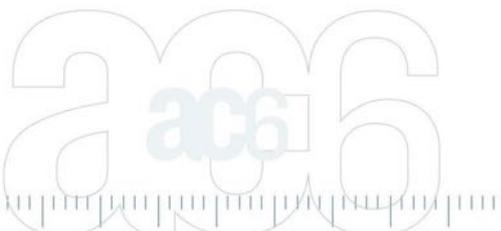
### Environmental conditions

Temperatura ambiente:  $(23 \pm 2) ^\circ\text{C}$

*Ambient temperature:*

*En caso de existir discrepancias en el texto como consecuencia de la traducción, prevalecerá el texto en español.  
In the event of any discrepancies in the text arising from translation, the Spanish text shall prevail.*

asesoramiento  
calibración  
metrología



## RESULTADOS

### Results

#### A.- Compresión con muelle

A. - Compression with spring

#### Serie de medida:

Measurement series:

$F_N$ (gf)	$F_1$ (gf)	$F_2$ (gf)	$F_3$ (gf)	$F_{media}$ (gf)
0	0,0	0,0	0,0	0,0
58	57,5	57,4	58,0	57,6
82	81,7	82,0	81,9	81,9
132	131,7	131,9	131,5	131,7
186	186,1	185,8	184,7	185,5

#### Corrección (c); errores relativos de repetibilidad (b), resolución (a) e interpolación (fc):

Correction (c); repeatability relative error (b), resolution (a) e interpolation (fc):

$F_N$ (gf)	c (%)	b (%)	a (%)	$f_c$ (%)	W (%)
58	-0,69	1,06	0,02	0,32	0,73
82	-0,11	0,37	0,01	0,29	0,45
132	-0,24	0,35	0,01	0,27	0,45
186	-0,27	0,77	0,01	0,25	0,56

#### Errores relativos de cero:

Zero relative errors:

Serie	1	2	3
$f_0$ (%)	0,00	0,00	0,00

#### Polinomio de interpolación:

Interpolation polynomial:

$$F_p = A + B * X_i + C * X_i^2 + D * X_i^3$$

A	B	C	D
-5,180584E-02	9,977362E-01	----	----

Coefficiente de correlación = 0,999996

Correlation coefficient

**B.- Compresión con muelle y tope A**
*B.- Compression with spring and top A*
**Serie de medida:**
*Measurement series:*

<b>F<sub>N</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>1</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>2</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>3</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>media</sub></b> <b>(gf)</b>
0	0,0	0,0	0,0	0,0
137	137,2	137,0	136,1	136,8
164	163,4	163,4	163,7	163,5
209	208,9	209,6	209,1	209,2
247	247,5	246,9	246,8	247,1

**Corrección (c); errores relativos de repetibilidad (b), resolución (a) e interpolación (fc):**
*Correction (c); repeatability relative error (b), resolution (a) e interpolation (fc):*

<b>F<sub>N</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>c</b> <b>(%)</b>	<b>b</b> <b>(%)</b>	<b>a</b> <b>(%)</b>	<b>f<sub>c</sub></b> <b>(%)</b>	<b>W</b> <b>(%)</b>
137	-0,18	0,78	0,01	0,08	0,57
164	-0,29	0,16	0,01	0,06	0,45
209	0,09	0,34	0,00	0,04	0,45
247	0,02	0,31	0,00	0,03	0,45

**Errores relativos de cero:**
*Zero relative errors:*

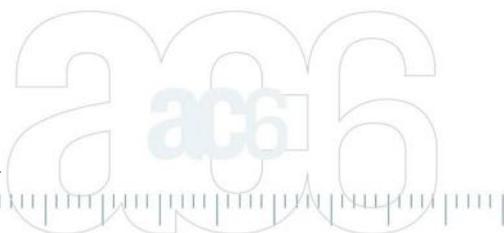
<b>Serie</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>f<sub>0</sub> (%)</b>	0,00	0,00	0,00

**Polinomio de interpolación:**
*Interpolation polynomial:*

$$F_p = A + B * X_i + C * X_i^2 + D * X_i^3$$

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
-1,541960E-01	1,000369E+00	---	---

Coeficiente de correlación = 0,999992

*Correlation coefficient*


**C.- Compresión con muelle y topes A+B***C.- Compression with spring and tops A+B***Series de medida:***Measurement series:*

<b>F<sub>N</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>1</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>2</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>3</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>media</sub></b> <b>(gf)</b>
0	0,0	0,0	0,0	0,0
204	205,7	201,0	204,4	203,7
200	201,3	199,7	199,0	200,0
260	259,6	260,9	258,6	259,7
299	297,5	300,3	299,9	299,2

Corrección (c); errores relativos de repetibilidad (b), resolución (a) e interpolación (fc):

*Correction (c); repeatability relative error (b), resolution (a) e interpolation (fc):*

<b>F<sub>N</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>c</b> <b>(%)</b>	<b>b</b> <b>(%)</b>	<b>a</b> <b>(%)</b>	<b>f<sub>c</sub></b> <b>(%)</b>	<b>W</b> <b>(%)</b>
204	-0,14	2,30	0,00	0,03	1,41
200	0,00	1,17	0,01	0,04	0,76
260	-0,11	0,86	0,00	0,03	0,58
299	0,07	0,95	0,00	0,02	0,66

**Errores relativos de cero:***Zero relative errors:*

<b>Serie</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>f<sub>0</sub> (%)</b>	0,00	0,00	0,00

**Polinomio de interpolación:***Interpolation polynomial:*

$$F_p = A + B * X_i + C * X_i^2 + D * X_i^3$$

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
-6,907384E-02	9,999953E-01	---	---

Coeficiente de correlación = 0,999997

*Correlation coefficient*

**D.- Compresión con muelle y topes A+B+C**
*D.- Compression with spring and tops A+B+C*

Series de medida:

*Measurement series:*

<b>F<sub>N</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>1</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>2</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>3</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>F<sub>media</sub></b> <b>(gf)</b>
0	0,0	0,0	0,0	0,0
247	254,2	244,9	242,7	247,3
243	243,1	242,8	242,6	242,9
295	297,4	293,9	293,7	295,0
342	345,4	343,3	337,6	342,1

Corrección (c); errores relativos de repetibilidad (b), resolución (a) e interpolación (fc):

*Correction (c); repeatability relative error (b), resolution (a) e interpolation (fc):*

<b>F<sub>N</sub></b> <b>(gf)</b>	<b>c</b> <b>(%)</b>	<b>b</b> <b>(%)</b>	<b>a</b> <b>(%)</b>	<b>f<sub>c</sub></b> <b>(%)</b>	<b>W</b> <b>(%)</b>
247	0,11	4,66	0,00	-0,02	2,87
243	-0,06	0,21	0,00	-0,02	0,45
295	0,00	1,24	0,00	-0,02	0,86
342	0,03	2,30	0,00	-0,02	1,40

Errores relativos de cero:

*Zero relative errors:*

<b>Serie</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>f<sub>0</sub> (%)</b>	0,00	0,00	0,00

Polinomio de interpolación:

*Interpolation polynomial:*

$$F_p = A + B \cdot X_i + C \cdot X_i^2 + D \cdot X_i^3$$

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
-3,940791E-03	1,000222E+00	----	----

Coeficiente de correlación = 0,999999

*Correlation coefficient*

Se dan a continuación una lista de los parámetros empleados en este procedimiento:

*The list of parameters used in this procedure are given below:*

Símbolo <i>Symbol</i>	Unidad <i>Unit</i>	Descripción <i>Description</i>
$F_N$	gf	Fuerza indicada por el instrumento a verificar para valores de fuerza crecientes. <i>Indicated force by the instrument to check increasing strength values.</i>
$F_{1..F_n}$	gf	Fuerza real indicada por el patrón, para valores de fuerza crecientes. <i>Real force indicated by standard for increasing force values.</i>
$F_{media}$	gf	Media aritmética de las distintas medidas de $F$ para un mismo escalón de fuerza. <i>Arithmetic average of <math>F</math> different measures of the same force step.</i>
$X_i$	gf	Indicación del Instrumento. <i>Unit under test reading.</i>
$F_p$	gf	Valor corregido con el polinomio <i>Corrected value with the polynomial</i>
$c$	%	Corrección relativa. $\left( c = \frac{F_{media} - F_i}{F_{media}} \times 100 \right)$ . <i>Relative correction.</i>
$b$	%	Error relativo de repetibilidad de medida. <i>Measurement repeatability relative error.</i>
$f_0$	%	Error relativo de cero. <i>Relative zero error</i>
$a$	%	Error relativo de resolución. <i>Relative resolution error.</i>
$f_c$	%	Error relativo de interpolación. <i>Relative interpolation error.</i>
$W$	%	Incertidumbre relativa expandida. <i>Relative expanded uncertainty.</i>

Los valores de corrección relativa indicados en % del punto de calibración, corresponden a la cantidad que hay que sumar algebraicamente a la lectura del mensurando para obtener la fuerza convencionalmente verdadera.

*The relative correction values indicated in % of calibration point, correspond to the amount which must be added algebraically to measurement reading to obtain conventionally true strength.*

La incertidumbre relativa expandida de medida se ha obtenido multiplicando la incertidumbre relativa típica de medición por el factor de cobertura  $k=2$  que para una distribución normal corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95%. La incertidumbre típica de medida se ha determinado conforme al documento EA-4/02.

*The reported relative expanded uncertainty is stated as the standard relative uncertainty multiplied by  $k=2$  and has been determined according to EA4/02. The coverage factor  $k=2$  for a normal distribution corresponds to a coverage probability of approximately 95%.*

**En el cálculo de la incertidumbre se han tenido en cuenta las contribuciones debidas al error relativo de repetibilidad, de cero, de resolución y a los patrones usados en la calibración.**

*Repeatability, resolution, used standards and zero relative errors contributions were not taken into account in the calculation of uncertainty.*

Los resultados se refieren únicamente a los objetos sometidos a ensayo o calibración y al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones.

*The results relate only to the obtained measured values and do not imply any performance data with respect to the long term stability of the instrument.*

En caso de existir discrepancias en el texto como consecuencia de la traducción, prevalecerá el texto en español.  
*In the event of any discrepancies in the text arising from translation, the Spanish text shall prevail.*





Número 116191  
Number

Página 8 de 8  
Page of

## OBSERVACIONES

### Notes

Se envía etiqueta de calibración.

*A calibration label is included with the certificate.*

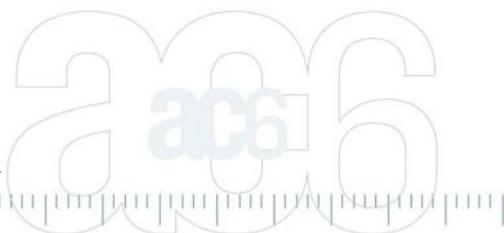
La Unidad Básica de Fuerza del Sistema Internacional de Unidades es el Newton:

*Force basic unit in International System of Units is the Newton:*

$$1 \text{ gf} = 0,00980665 \text{ N}$$

*En caso de existir discrepancias en el texto como consecuencia de la traducción, prevalecerá el texto en español.*  
*In the event of any discrepancies in the text arising from translation, the Spanish text shall prevail.*

ac6  
calibración  
metrología



## **9.2. INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA**





Centro de Cirugía de Mínima Invasión  
Minimally Invasive Surgery Centre

Jesús Usón

## INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL-CCMIJU

Ref.: 003/18

El Comité de Ética en Experimentación Animal del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón se encuentra habilitado para evaluar proyectos que utilicen animales de experimentación por el Gobierno de Extremadura desde el 24 de julio de 2013, en virtud de lo establecido en 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, incluyendo la docencia. Este Comité,

**INFORMA:** Que en Reunión Ordinaria celebrada el día 25 de enero del presente año evaluó la solicitud de evaluación del proyecto que lleva por título: "Influencia de la fuerza de compactación del xenoinjerto particulado en la angiogénesis durante la regeneración ósea", cuyo Investigador Principal es D./Dña. Fco. Javier Vela González y tras considerar los siguientes aspectos:

- Finalidad y beneficios científicos.
- Conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento.
- Clasificación de los procedimientos en función del grado de severidad.
- Análisis del balance de daños y beneficios
- Situaciones y exenciones previstas en los artículos 6, 7, 9.1, 19, 20, 21, 22, 23, 25.3 y 5, 26 y 29 del R. D. 53/2013, de 1 de febrero.
- Necesidad de evaluación retrospectiva,

**DECIDE:** Emitir INFORME FAVORABLE sobre el precitado proyecto, asignándole un GRADO DE SEVERIDAD MODERADO y determina la necesidad de NO llevar a cabo una EVALUACIÓN RETROSPECTIVA del proyecto tras su autorización.

Lo que firmo, para que así conste, en Cáceres a 17 de enero de 2018.

Fdo. Luis Dávila Gómez  
Secretario del CEEA-CCMIJU



### **9.3. APROBACIÓN DE PROYECTO POR LA JUNTA DE EXTREMADURA**



Consejería de  
Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio

*Dirección General de  
Agricultura y Ganadería*

Avda. Luis Ramallo s/n  
06800 Mérida  
Teléfono: 924002000  
Fax: 924332888

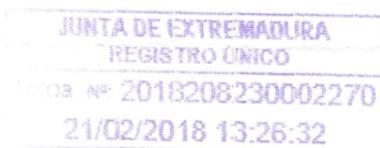
JUNTA DE EXTREMADURA

**CENTRO DE CIRUGÍA DE MINIMA INVASIÓN  
"JESÚS USÓN"**

**A/A D. Fco. Javier Vela González**

**CTRA. N521 KM41.8**

**10071-CACERES**



Expediente Nº : EXP-20180216  
ref :CGA/mbr

**Autorización proyecto: "Influencia de la fuerza de compactación del xenoinjerto  
particulado en la angiogenesis durante la regeneración ósea"**

Se adjunta resolución del Director General de Agricultura y Ganadería conforme a su solicitud de fecha 9 de febrero de 2018, con nº de registro: 2018209020001981, referente a la autorización de proyecto de investigación con animales de experimentación, conforme a lo establecido en 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, incluyendo la docencia".

Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, podrán los interesados interponer Recurso de Alzada ante la Consejera de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio en el plazo de UN MES, contados a partir del día siguiente a la recepción de la notificación de esta Resolución, tal y como disponen los artículos 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 01 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas. Todo ello sin perjuicio de que el interesado pueda ejercitar cualquier otro recurso que estime procedente.

Mérida, a 16 de febrero de 2018  
**Jefe de Sección de Bienestar Animal**

Fdo.: Cristina García Arjona

Consejería de  
Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio

*Dirección General de  
Agricultura y Ganadería*

Avda. Luis Ramallo s/n  
06800 Mérida  
Teléfono: 924002000  
Fax: 924332888

**RESOLUCION DE AUTORIZACIÓN DE PROYECTO CON FINES CIENTÍFICOS Y/O DE DOCENCIA EN EL QUE SE REALIZAN PROCEDIMIENTOS SOBRE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Vista la solicitud presentada por D. Francisco Javier Vela González con fecha 16 de febrero de 2018 para la autorización del procedimiento de la memoria técnica titulada: **"Influencia de la fuerza de compactación del xenoinjerto particulado en la angiogenesis durante la regeneración ósea"** " que se llevará a cabo en el establecimiento usuario Centro de Cirugía de Mínima Invasión "Jesús Usón" con código REGA: **ES 100370001499**, y siendo el responsable del proyecto D. Francisco Javier Vela González con DNI 76049555D.

Vistos los informes del Comité de ética de experimentación animal del establecimiento usuario, donde se determina que no existe necesidad de evaluación retrospectiva del mencionado proyecto, y del Servicio de Sanidad Animal;

Considerando que el citado proyecto se ajusta a lo establecido en 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, incluyendo la docencia;

Esta Dirección General de Agricultura y Ganadería ha resuelto: **autorizar** la realización del proyecto referenciado siempre que se mantengan las condiciones que dieron lugar a la autorización y que el personal que intervenga posea la preparación y formación adecuada que se especifica en el citado Real Decreto.

Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, podrán los interesados interponer Recurso de Alzada ante el Consejero de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio en el plazo de UN MES, contados a partir del día siguiente a la recepción de la notificación de esta Resolución, tal y como disponen los artículos 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 01 de octubre del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas. Todo ello sin perjuicio de que el interesado pueda ejercitar cualquier otro recurso que estime procedente.

Mérida, a 16 de febrero de 2018

**EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERIA**

Fdo.: Antonio Cabezas García



#### **9.4. INDICIOS DE CALIDAD DE LA TESIS**



#### **9.4.1. Publicación de Artículo: Revista DYNA**

“*Design of a precision compactor for use in guided bone regeneration in the area of oral surgery*” en la revista DYNA de ingeniería multidisciplinar que esta incluida en Science Citation Index y con un factor de impacto en 2020 de 0,945.

Brizuela-Velasco A, Jiménez-Garrudo A, **Viteri-Agustín I**, Chávarri-Prado D, Pérez-Pevida E, Diéguez-Pereira M, Montalban-Vadillo O, Bellanco De la Pinta I, Chento-Valiente Y, Solaberrieta-Méndez E, Lou-Bonafonte JM. Design of a precision compactor for use in guided bone regeneration in the area of oral surgery. Dyna. 2019 Jan 1;94(1):53-8.



## DESIGN OF A PRECISION COMPACTOR FOR USE IN GUIDED BONE REGENERATION IN THE AREA OF ORAL SURGERY.

Aritza Brizuela-Velasco<sup>1</sup>, Antonio Jiménez-Garrudo<sup>1</sup>, Iratxe Viteri-Agustín<sup>2</sup>, David Chávarri-Prado<sup>3</sup>, Esteban Pérez-Pevida<sup>2</sup>, Markel Diéguez-Pereira<sup>3</sup>, Oier Montalbán-Vadillo<sup>2</sup>, Iker Bellanco-de la Pinta<sup>2</sup>, Yelko Chento-Valiente<sup>4</sup>, Eneko Solaberrieta-Méndez<sup>5</sup>, José Manuel Lou-Bonafonte<sup>6</sup>

<sup>1</sup>University of Salamanca. School of Medicine. Alfonso X el Sabio s/n, 37007 Salamanca. Tel.:+34 923 294541.

<sup>2</sup>University of Zaragoza. School of Health Sciences and Sports. University Place 2, 22002 Huesca.

<sup>3</sup>University of Oviedo. School of Medicine and Health Sciences. Av. Julián Clavería, s/n, 33006 Oviedo, Asturias.

<sup>4</sup>Private Practice as an engineer in Bilbao, Bizkaia, País Vasco.

<sup>5</sup>University of País Vasco UPV/EHU Ingeniery School of Gipuzkoa, Graphic Design and Projects Department, Donostia

<sup>6</sup>Health Research Institute of Aragón. University of Zaragoza. School of Health Sciences and Sports. 22002 Huesca

Received: 24/May/2018-Reviewing:28/May/2018-Accepted: 19/Sep/2018 – DOI: <http://dx.doi.org/10.6036/8858>

### ABSTRACT:

During the processes of guided bone regeneration in the maxillary bones, which aim to recover or preserve support tissue for the placement of implants on which dental prostheses are retained, the use of various particulate graft biomaterials from different sources (animal or synthetic) is standardized. At present, the pressure of compaction of this material in the recipient bone is manual, dependent on the clinician, although there is some scientific evidence on the effects of different compressive forces on angiogenesis and prognosis of the regeneration of the grafted areas.

The aim of the present study is to design, calibrate and verify in vitro a compaction instrument for clinical use, which allows a controlled and precise compaction pressure of the particulate graft biomaterial and standardize the procedure.

The designed instrument is a precision compactor of adequate size for proper intra and extraoral clinical manageability and manufactured in a sterilizable material by autoclaving. The range of compression that allows (0 -1,82 Newton), is within the forces that are commonly applied in surgery and that have been determined by a specific test on 8 oral surgeons. Instrument calibration has been performed by an independent accredited company.

The testing of the instrument was carried out by an in vitro test where the biomaterial was compacted at different forces (0,80 and 1,82 Newton) and was observed by a computerized micro-tomography that when increasing the compression force, decreased the space between particles provided for the migration and proliferation of new blood vessels and cells.

**Key Words:** bone regeneration, compaction, instrument, compactor, particle biomaterial, bone graft.

### RESUMEN:

Durante los procedimientos de regeneración ósea guiada en los huesos maxilares, que tienen como objetivo recuperar o preservar tejido de soporte para la colocación de implantes sobre los que se retienen las prótesis dentales, está estandarizado el uso de diversos biomateriales de injerto particulado de diferente procedencia (animal o sintético). En la actualidad la presión de compactación de dicho material en el hueso receptor es manual, clínico dependiente, pese a que existe cierta evidencia científica sobre los efectos de las diferentes fuerzas de compresión en la angiogénesis y pronóstico de la regeneración de las zonas injertadas.

El objetivo del presente estudio es el de diseñar, calibrar y comprobar in vitro un instrumento de compactación para uso clínico, que permita una presión de compactación controlada y precisa del biomaterial de injerto particulado y estandarizar el procedimiento.

El instrumento diseñado es un compactador de precisión de tamaño adecuado para una correcta manejabilidad clínica intra y extraoral y fabricado en un material esterilizable por autoclavado.

El rango de compresión que permite (0 – 1,82 Newton), está dentro de las fuerzas que se aplican comúnmente en cirugía y que se han determinado mediante una prueba específica sobre 8 cirujanos orales. La calibración del instrumento se ha realizado por una empresa acreditada independiente.

La comprobación del instrumento se ha realizado mediante un ensayo in vitro donde se compactó el biomaterial a diferentes fuerzas (0,80 y 1,82 Newton) y se observó mediante micro-tomografía computerizada que al aumentar la fuerza de compresión disminuía el espacio entre partículas provisto para la migración y proliferación de los nuevos vasos sanguíneos y células.

**Palabras Clave:** regeneración ósea, compactación, instrumento, compactador, biomaterial particulado, injerto óseo.



Ingeniería e Industria  
RESEARCH ARTICLE

DESIGN OF A PRECISION COMPACTOR FOR USE IN GUIDED BONE  
REGENERATION IN THE AREA OF ORAL SURGERY

Aritz Brizuela Velasco, Antonio Jiménez Garrudo, Iratxe Viteri-Agustín,  
David Chávarri Prado, Esteban Pérez Pevida, Markel Diéguez Pereira, Oier  
Montalbán Vadillo, Iker Bellanco de la Pinta, Yelko Chento Valiente, Eneko  
Solaberrieta Méndez, José Manuel Lou Bonafonte.

BIOTECHNOLOGY

Odontology

## 1.- INTRODUCTION

The disciplines of Medicine and Dentistry are constantly developing to obtain better diagnoses and treatments for patients. In this sense, technology and engineering are crucial for the ever-increasing supply of more reliable and effective tools that involve less invasive and more predictable treatments.

Oral implantology is a medical discipline with a high level of development that has obtained major benefits from technological innovations. This discipline deals with the functional and aesthetic recovery of edentulous patients by placing implants of various metal alloys in the maxillary bones to provide support and retention to dental prostheses [1].

The use of dental implants for such purpose has experienced exponential growth since its inception. In fact, in the United States in 2001, it was estimated that approximately 450,000 implantations were carried out [2], while in 2013, this figure reached 1.26 million, and it is expected to continue increasing [3].

The reabsorption of the maxillary bone that inevitably follows tooth loss often causes a significant problem in achieving satisfactory oral rehabilitation with dental implants [4]. On the one hand, the remaining bone volume can be so critical that it does not even allow an implant to be housed, even one with a narrow (less than 4 mm) or short (less than 8 mm) diameter. On the other hand, there is enough evidence to show that an adequate bone volume ensures good long-term results [5,6].

The development over the last 30 years of guided bone regeneration (GBR) techniques, based on new materials and procedures, allows the predictable modification of the maxillary bone anatomy that has been altered by resorption [7,8], thus recovering adequate bone volumes for the placement of dental implants.

GBR is the best documented technique for the treatment of bone defects located in the maxillary bones. This is a procedure with high success rates that is based on priming the development of the cell biotype sought to be regenerated (in this case, the bone), isolating it from other unwanted tissues (soft tissues) by using barrier membranes [9,10]. The success or failure of these procedures ultimately depends on the efficiency of the barrier membrane, the maintenance of the space and a correct surgical technique.

Barrier membranes are essential for guided bone regeneration. Their main function is to act as a physical obstacle to prevent soft-tissue invasion into the bone defect [11]. In experimental and clinical studies, a wide variety of membrane materials, both resorbable and non-absorbable, have been used.

Different types of graft materials are available. These are classified according to their origin as autografts (tissue that is transferred from one position to another within the same individual), allografts (tissue that is transferred between members of the same species), xenografts (tissue transferred between members of different species) and synthetic materials or alloplastic grafts (artificially generated in laboratories), for which different properties have been described.

Currently, the maintenance of the spatial volume of the bone to be regenerated is considered the main function of the bone graft or substitute material. Essentially, the membrane separates the different types of tissues, and the graft prevents the membrane from collapsing, generating a scaffolding that allows the migration and proliferation of blood vessels and cells, which are crucial for the formation of new bone [12,13].

Xenografts are the most used materials for this purpose. There is an extensive bibliography that supports their use. Bovine, porcine and natural coral origin xenografts are most commonly used. Generally, the commercial presentation of these biomaterials comes in particles of 0.25 mm to 2 mm in size. An example of a bovine-origin xenograft of 0.5 to 1 mm in particle size (Cerabone® Botiss Biomaterials GmbH, Dieburg, Germany) is shown in fig. (1)



Fig. 1: Particulate Xenograft 0.5 - 1.0 mm.

The morphological characteristics and surgical technique are very important for the outcome of bone regeneration. The placement technique and packaging of the biomaterial also seem to influence the outcome [14,15].

The compaction of the biomaterial during surgery is usually carried out with different manual compactors, disregarding the force applied on the biomaterial, which is inherent to the subjective sensation of each surgeon.

It is assumed that an excessive compaction of the biomaterial could cause, on the one hand, a fracture of the particles and, on the other, a reduction in the space between them, which could hinder the penetration of cells and new blood vessels. In turn, a poor compaction could leave an excessive space between particles, obtaining a smaller area of biomaterial for cellular apposition, which could allow small micro-movements. Several preclinical studies in animal models have attempted to establish the relationship between the compression of the graft material and the result of the regeneration [14,15]. The great limitation of these studies is that the methods used for graft compaction (weights and coins) are not transferable to the clinic.

Therefore, this work aims to design and calibrate an instrument to accurately control the compaction pressure of a particulate graft, with characteristics suitable for clinical use in the oral cavity. A second objective is to verify (using our instrument) the influence of the pressure applied on the resulting spaces between the particles on the migration and proliferation of new vessels and cells.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1.- PROCEDURE

Currently, although bone regeneration by means of particulate grafts is a frequent procedure in oral surgery, there is no compaction tool capable of measuring the force applied. Therefore, our research team had the need to develop this tool.

Initially, we based our design on the idea of a dynamometer and its possible clinical uses and manageability. The dynamometer, invented by Sir Isaac Newton (1643-1727), is a tool that allows the calculation of the weight of a body or the measurement of a force based on changes in the deformation of a spring with a certain calibration.



Ingeniería e Industria  
RESEARCH ARTICLE

DESIGN OF A PRECISION COMPACTOR FOR USE IN GUIDED BONE  
REGENERATION IN THE AREA OF ORAL SURGERY

Aritza Brizuela Velasco, Antonio Jiménez Garrudo, Iratxe Viteri-Agustín,  
David Chávarri Prado, Esteban Pérez Pevida, Markel Diéguez Pereira, Oier  
Montalbán Vadillo, Iker Bellanco de la Pinta, Yelko Chento Valiente, Eneko  
Solaberrieta Méndez, José Manuel Lou Bonafonte.

BIOTECHNOLOGY

Odontology

The traditional dynamometer bases its operation on the stretching of a spring, following Hooke's law of elasticity, where the deformation is proportional to the force applied:

Where:

$$F = k \cdot x$$

*F* is the force applied to the spring;  
*k* is the spring's elasticity constant; and  
*x* is a vector that indicates the variation of the length of the spring.

In this case, our objective was to measure compression. To clarify what we intended to achieve, a simple homemade compactor was developed using a ballpoint pen, a metal shank and a compression spring.

To determine the pressure range of the compactor, we conducted a study with the participation of 8 experienced oral surgeons. A biomaterial was placed in a container on a precision scale (SBS-LW-2000A-2000g/0.01g by Steinberg Systems, Poland), while the surgeons applied pressure to it simulating the compaction performed during an intra-surgical intervention.

Table 1 shows a descriptive statistical analysis of the pressure values obtained by each surgeon. The mean values reveal certain differences in the pressures applied by the different surgeons. Additionally, there is an important difference between the minimum and maximum pressures applied, 0.09 newtons (N) and 1.49 N, respectively. The overall mean was  $0.52 \pm 0.24$  N.

Surgeon	N	Mean	Standard deviation	Standard error	95% confidence interval		Minimum	Maximum
					Lower limit	Upper limit		
1	50	37.6078	15.75827	2.20660	33.1758	42.0399	9.00	72.00
2	50	37.0200	15.48863	2.19042	32.6182	41.4218	10.00	87.00
3	50	65.0600	20.23778	2.86205	59.3085	70.8115	20.00	105.00
4	50	78.8400	31.78265	4.49475	69.8075	87.8725	24.00	152.00
5	50	42.1600	17.11708	2.42072	37.2954	47.0246	13.00	98.00
6	50	67.0400	22.11469	3.12749	60.7551	73.3249	15.00	123.00
7	50	48.0577	18.13718	2.51517	43.0083	53.1071	14.00	91.00
8	50	52.8269	20.31876	2.81770	47.1701	58.4837	19.00	91.00
Total	400	53.5062	24.98996	1.24176	51.0651	55.9473	9.00	152.00

Table 1: Descriptive statistical analysis (gram-force units).

Next, Levene's statistical method was used to evaluate the equality of the variances for a calculated variable (pressure) for two or more groups (surgeons). This analysis tests the null hypothesis "Ho: There is a homogeneity of variances or homoscedasticity". Once the analysis was carried out, we obtained a probability value, significance or p value  $<0.05$ , so the null hypothesis is rejected. It was thus concluded that not all variances are equal; that is, it was confirmed that the differences between the mean values of the sample are too large to be attributed only to chance.

Once the possibility of homoscedasticity within the analysed population was discarded, Dunnett's T3 post hoc test was carried out, which allows a pairwise comparison to determine whether there are certain sample populations (pressure applied by certain surgeons) different from one another and identify them. Once the test was done, we observed that certain sample populations are relatively homogeneous with each other (GROUP 1: Surgeons 1, 2 and 5, with p value >0.9; GROUP 2: Surgeons 3 and 6, with p value >0.9; and GROUP 3: Surgeons 7 and 8, with p value >0.9). Therefore, it is possible to affirm that there are significant differences between the pressures applied by the surgeons according to the groups indicated above, as shown in Fig. (2).

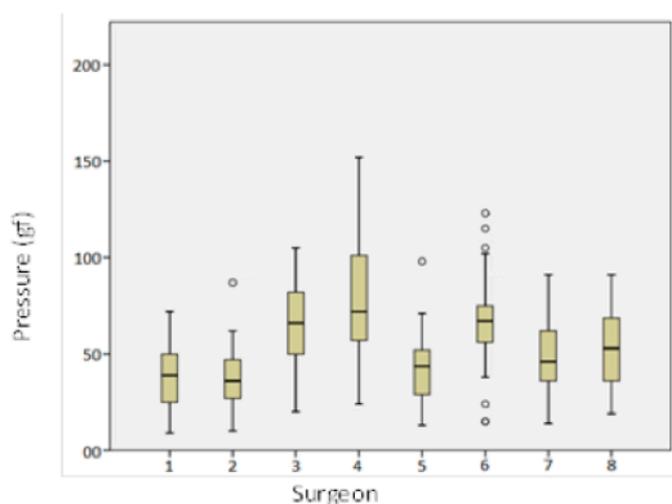


Fig. 2: Box plot presenting the data obtained.

After analysing the results and concluding that the sample differences are not due to random variations in the sampling and that there are significant differences between the different sample populations, we decided to consider a pressure range in the instrument's design to cover at least the full pressure range exerted by the surgeons in the study (between 0.09 and 1.49 N).

All the statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics software, version 22.0 for Windows and the different office tools included in Microsoft Office 2010.

## 2.2.- CHARACTERISTICS OF THE INSTRUMENT

From this initial idea and considering certain desirable characteristics, we developed this design, best represented by the plans in Fig. (3).

It was manufactured in a conventional lathe (SC200 by Pinacho, Huesca, Spain) by an expert lathe machinist from a specialised workshop. It has been mechanised in stainless steel so that it can be sterilised. It is similar in size to a ballpoint pen or manual compactor to allow its use in intraoral compaction.

DESIGN OF A PRECISION COMPACTOR FOR USE IN GUIDED BONE  
REGENERATION IN THE AREA OF ORAL SURGERY

Aritza Brizuela Velasco, Antonio Jiménez Garrudo, Iratxe Viteri-Agustín,  
David Chávami Prado, Esteban Pérez Pevida, Markel Diéguez Pereira, Oier  
Montalbán Vadillo, Iker Bellanco de la Pinta, Yeiko Chento Valiente, Eneko  
Solaberrieta Méndez, José Manuel Lou Bonafonte.

BIOTECHNOLOGY

Odontology

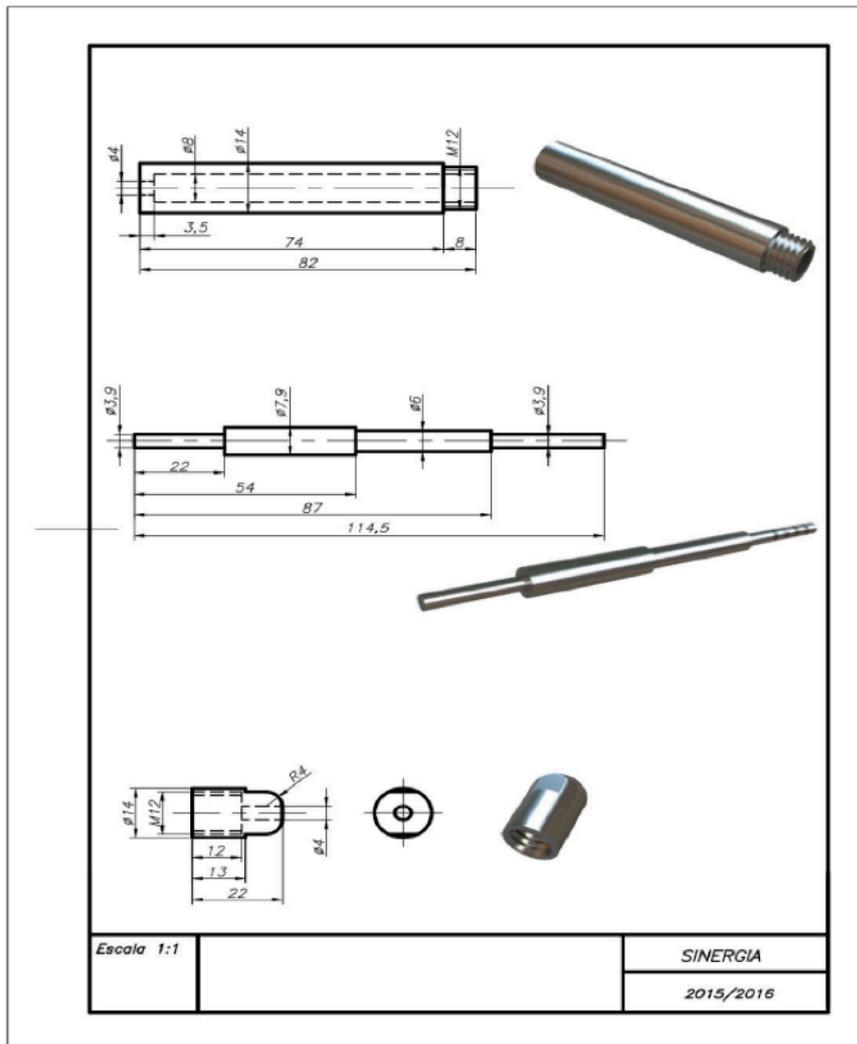


Fig. 3: Plans for the instrument's prototype.

The instrument consists of a compactor whose operation is based on a simple compression dynamometer. It features a solid shank of 7.9 mm in diameter that slides inside a hollow cylinder with an internal diameter of 8 mm. The shank has at one end a circular active tip of 3.9 mm in diameter, similar to that of any clinical compactor. At the other end, it has a recess where the spring is inserted and a visible posterior extension (outside the hollow cylinder) with a stripe-marking system. The hollow cylinder through which the shank slides has a threaded end for the insertion of the cap. The cap has a threaded design that allows the replacement of the spring if it loses its properties or achieving greater compaction forces by replacing the spring or adding stops.

A compression spring was specially designed for this study, complying with the necessary characteristics in terms of the design and the range of compression forces to be measured. The spring is made of stainless steel (EN 10270-3, INOX-AISI 302) and is 67.55 mm in length, with an outside diameter of 7.1 mm and an inside diameter of 6.1 mm. The wire diameter (thickness) is 0.5 mm. The spring has 30 turns with a pitch (average distance between two active turns of the spring) of 2.37 mm.

The spring will compress at a distance proportional to the force applied on it, and the elasticity constant ( $k$ ) is equal to 0.0076 DaN/mm. With the maximum load (0.40 DaN), the spring compresses entirely, reaching a length of 15 mm.

### 2.3.- CALIBRATION

This instrument is capable of compacting with a precise and calibrated force range. Table (2) shows the calibration values at the different shank markings.

The calibration was carried out by an independent calibration company (Ac6 Metrología SL, Navarra, Spain) accredited by the National Accreditation Entity (Entidad Nacional de Acreditación- ENAC). Three measurement series were performed with increasing force values at compression by comparison with a standard transducer (Z30, nº 09130043 of HBM, Madrid, Spain). The resolution is 0.00980665 N. The measurand was established between the start and end of each mark, confirming that the variation between the start and end is approximately 0.0686 N.

Linea (L)	$F_N$ (N)	$c$ (%)	$W$ (%)
1	0.57	-0.69	0.73
2	0.80	-0.11	0.45
3	1.29	-0.24	0.45
4	1.82	-0.27	0.56

Table 2: Calibration results at the different forces measured by this instrument.

$F_N$ : Force indicated by the instrument to be verified for increasing force values;  $c$  = Relative correction (values indicated in %, corresponding to the amount that must be algebraically added to the reading of the measurand to obtain the conventionally real force);  $W$  = Relative expanded uncertainty (corresponding to a coverage probability of approximately 95%, considering contributions due to the relative errors of the repeatability, zero, resolution and the standards used in the calibration).

### 2.4.- IN VITRO ASSAYS

To test the objectives, we conducted an assay performing 3 compactions using our instrument on  $0.20 \pm 0.01$  grams of bovine-origin xenograft with a 0.5 to 1 mm particle size (Cerabone<sup>®</sup> by Botiss Biomaterials GmbH, Dieburg, Germany). The assay was conducted at different forces in test tubes, and the compaction and reorganisation of the xenograft particles were observed by means of microcomputed tomography (micro-CT).

To quantify the 3D microstructure, the samples were scanned by a high-resolution micro-CT (SkyScan 1174 by Bruker, Kontich, Belgium). The images were obtained by X-rays at a voltage of 50 kV and an amperage of 800  $\mu$ A.

All samples were scanned using a 1 mm aluminium filter at a resolution of 11.8 pixels. We obtained a set of 613 images for each sample, with a rotation pitch of  $0.3^\circ$  and an average of 2 frames for a total rotation of  $180^\circ$ . The scanning time for each sample was approximately 3 hours using an exposure time of 8500 ms. A flat-field correction was performed at the beginning of each scan. The images obtained during the scanning were reconstructed using the software NRecon



Ingeniería e Industria  
RESEARCH ARTICLE

DESIGN OF A PRECISION COMPACTOR FOR USE IN GUIDED BONE  
REGENERATION IN THE AREA OF ORAL SURGERY

Antza Brizuela Velasco, Antonio Jiménez Garrudo, Iratxe Viteri-Agustín,  
David Chávarri Prado, Esteban Pérez Pevida, Markel Diéguez Pereira, Oier  
Montalbán Vadillo, Iker Bellanco de la Pinta, Yelko Chento Valiente, Eneko  
Solaberrieta Méndez, José Manuel Lou Bonafonte.

BIOTECHNOLOGY

Odontology

(Control Software, SkyScan 1174 by Bruker, Kontich, Belgium). The correction values of the attenuation coefficient, beam hardening, smoothing and reduction of ring artefacts were the same in all samples. A porosity analysis was performed with the software CTAn (Software for measurements and visualisation, SkyScan 1174 by Bruker, Kontich, Belgium). The volume of interest (VOI) was manually delimited in each sample. The global greyscale threshold levels for these areas were between 68 and 255.

### 3. RESULTS

A compactor instrument capable of measuring the force at which a biomaterial is being compacted has been manufactured. Its characteristics (size, easy handling and material of elaboration) make it applicable for clinical use. A 3D simulation is presented in Fig. (4) to facilitate the understanding of the characteristics and operation of the instrument.



*Fig. 4: Simulation of the instrument in alveolar regeneration.*

The instrument can compact to certain standardised and calibrated forces.

The micro-CT shows the compaction and reorganisation of the xenograft particles used (Cerabone<sup>®</sup> from Botiss Biomaterials GmbH, Dieburg, Germany) at different compression forces, obtaining variations in the area where the vessels and cells should penetrate. In fact, without compression, free spaces occupy 55.80% of the sample. **When applying forces of 0.80 and 1.82 N, the spatial percentages decrease by 1.3 and 3.2%, respectively.** Figure 5 shows the representation of the images obtained by micro-CT.



Fig. 5: Micro-CT images of the structure of the particulate graft with a resolution of 11.8 pixels, a scanning time of 3 hours and an exposure time of 8500 ms.

#### 4.- DISCUSSION

An instrument with clinical manageability capable of compacting a biomaterial and measuring the compaction force applied has been successfully designed and developed. To date, the compaction of the biomaterial is carried out using different manual compactors, disregarding the force applied on the graft.

Since the development of the new bone depends on the creation of new blood vessels that provide progenitor cells and nutrients to the area under regeneration [16-19], the maintenance of the spaces between the biomaterial particles seems essential. This is a very relevant issue because it is understood that if small differences such as the micro- and nano-roughness of the surface or the wettability and porosity of the biomaterial can influence the results [14, 20], the disposition of the particles and therefore of the resulting spaces between them should also influence the results of the bone regeneration.

However, there is no clear scientific evidence regarding the influence of the force applied and the technique used for compacting the biomaterial on the results of bone regeneration. The only two studies available in the literature [14, 15] that evaluate the role of the compaction pressure of particulate bone grafts have been performed in animals, although they conclude that it does influence the results of the bone regeneration. However, these two studies apply compression using methods that cannot be extrapolated to oral or clinical surgery (one uses coins wrapped in aluminium foil [14], and another uses a weight system [15]). In addition, in one of the studies [14], the tested forces (4.1 - 8.2 g) are quite different from those that our first test with a group of oral surgeons has shown to be used in clinical practice.

The designed instrument bases its operation on a compression spring. The spring will compress at a distance proportional to the force applied on it; the constant of proportionality or elastic constant ( $k$ ) of the spring in this case is 0.0076 DaN/mm. The newly developed instrument can compact a biomaterial with determined, standardised and calibrated forces. These forces are correlated with those most commonly used in clinical practice because according to the aforementioned test, the average force applied by an experienced oral surgeon is  $0.52 \pm 0.24$  N, and the maximum force is 1.49 N. Nevertheless, with this design, different ranges of compressive force can be generated depending on the results of future in vivo research or different demands because springs with different elastic constants ( $k$ ) or stops in the spring route can be incorporated.

This instrument will allow us to:



Ingeniería e Industria  
RESEARCH ARTICLE

DESIGN OF A PRECISION COMPACTOR FOR USE IN GUIDED BONE  
REGENERATION IN THE AREA OF ORAL SURGERY

Aritza Brizuela Velasco, Antonio Jiménez Garrudo, Iratxe Viteri-Agustín,  
David Chávarri Prado, Esteban Pérez Pevida, Markel Diéguez Pereira, Oier  
Montalbán Vadillo, Iker Bellanco de la Pinta, Yelko Chento Valiente, Eneko  
Solaberrieta Méndez, José Manuel Lou Bonafonte.

BIOTECHNOLOGY

Odontology

- Determine in applied research studies (experimental animals) whether the compressive force on the bone graft packaging influences angiogenesis and bone regeneration and how such force influences the results and establish which compaction condition is preferable in a range corresponding to common clinical standards;
- Standardise future research studies on these biomaterials, eliminating possible confounding factors such as the compaction force; and
- Obtain better results in our bone regeneration procedures by performing the compaction in the force range considered the most suitable.

Regarding the influence of pressure on the reorganisation of the particulate graft, the micro-CT test showed that increasing the compressive force reduces the space between the particles provided for cell proliferation and migration, which may influence the angiogenesis in vivo and the final results of the bone regeneration. Although the reductions in the free space with applied forces of 0.80 and 1.82 N have been determined to be 1.3 and 3.2%, respectively, future research should evaluate whether this variation in the porosity will result in significant differences in in vivo studies.

In dentistry, the appearance of 2nd-generation periodontal probes was an advance similar to what our instrument offers. Compared to conventional probes, 2nd-generation probes are able to perform measurements with a controlled force. Periodontal catheterisation is one of the methods used to diagnose and monitor patients with periodontal disease [21, 22]. With conventional probes, the force applied during the probing process can be misleading [23-25]. In fact, the probing force with conventional probes varies between 3 and 140 grams, depending on the location to be probed and the professional who performs the probing [26]. The controlled strength achieved with the 2nd-generation periodontal probes produces an increase in inter-examiner reproducibility [26]. Therefore, 2nd-generation probes are a better tool for the diagnosis and control of these patients, providing greater validity to studies using this tool.

## 5. CONCLUSIONS

Currently, the placement of graft biomaterials during bone regeneration is done manually and is therefore clinically dependent. The force applied on the biomaterial during its implantation is neglected, despite the fact that there seems to be scientific evidence for the effects of different compressive forces on the biomaterial on the angiogenesis and on the prognosis of the regeneration.

A calibrated compaction instrument was designed and is suitable for clinical use due its characteristics (size and materials of elaboration) that could allow controlled and precise compaction of biomaterials.

An in vitro micro CT assay showed a reduction of the free spaces (provided for the penetration of vessels and cells during bone regeneration) when the compaction force increases. In fact, the spatial percentage decreases by 1.3 and 3.2% after applying forces of 0.80 and 1.82 N.

This instrument could allow us to standardise future research studies conducted on biomaterials and could even yield better results in bone regeneration procedures if we can prove, through in vivo studies, that these differences in the percentage of free space between biomaterial particles are significant.

## BIBLIOGRAPHY

1. "Glossary of Implant Terms". *Journal of Oral Implantology*. February 2003. Vol. 29-1. p. 29-40.
2. Sullivan RM. "Implant dentistry and the concept of osseointegration: a historical perspective". *Journal of California Dental Association*. November 2001. Vol. 29-11. p. 737-745.
3. DiMatteo AM, Lantanyshyn K. "Guide to implant dentistry". *Inside Dentistry*. April 2014. Vol. 10-4. p. 95-100.
4. Nishioka RS, Kojima AN. "Screw spreading: technical considerations and case report". *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. April 2011. Vol. 31-2. p. 141-147.
5. Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris G, et al. "Implant survival in maxillary and mandibular osseous onlay grafts and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up". *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. July-August 2009. Vol. 24-4. p. 695-703.

DESIGN OF A PRECISION COMPACTOR FOR USE IN GUIDED BONE  
REGENERATION IN THE AREA OF ORAL SURGERY

BIOTECHNOLOGY

Aritz Brizuela Velasco, Antonio Jiménez Garrudo, Iratxe Viteri-Agustín,  
David Chávarri Prado, Esteban Pérez Pevida, Markel Diéguez Pereira, Oier  
Montalbán Vadillo, Iker Bellanco de la Pinta, Yelko Chento Valiente, Eneko  
Solaberrieta Méndez, José Manuel Lou Bonafonte.

Odontology

6. Chou J, Hao J, Kuroda S, et al. "Bone regeneration of calvarial defect using marine calcareous-derived beta-tricalcium phosphate microspheres". *Journal of Tissue Engineering*. February 2014. Vol.21-5. p.1-7.(doi: : <http://dx.doi.org/10.1177/2041731414523441>).
7. Chiapasco M, Ferrini F, Casentini P, et al. "Dental implants placed in expanded narrow edentulous ridges with the Extension Crest device. A 1-3-year multicenter follow-up study". *Clinical Oral Implants Research*. June 2006. Vol.17-3. p.265-272. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01196.x>).
8. Annibali S, Bignozzi I, Sammartino G, et al. "Horizontal and vertical ridge augmentation in localized alveolar deficient sites: a retrospective case series". *Implant Dentistry*. June 2012. Vol. 21-3. p.175-185. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1097/ID.0b013e31824ee3e9>).
9. Nyman S, Karring T, Lindhe J, et al. "Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue". *Journal of Clinical Periodontology*. October 1980. Vol.7-5. p.394-401. (doi: : [10.1111/j.1600-051X.1980.tb02012.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.1980.tb02012.x)).
10. Gottlow J. "Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: Initial healing and long-term results". *Journal of Periodontology*. November 1993. Vol.64-11Suppl. p.1157-1165. (doi: : [10.1902/jop.1993.64.11s.1157](http://dx.doi.org/10.1902/jop.1993.64.11s.1157)).
11. Melcher AH. "On the repair potential of periodontal tissues". *Journal of Periodontology*. May 1976. Vol. 47-5. p.256-260. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1976.47.5.256>).
12. Melloning JT, Nevins M. "Guided bone regeneration of bone defects associated with implants: an evidence-based outcome assessment". *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. April 1995. Vol.15-2. p.168-185.
13. Nasr H, Aichelmann-Reidy ME, Yukna R. "Bone and bone substitutes". *Periodontology 2000*. February 1999. Vol. 19. p.74-86. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00148.x>).
14. Romanos GE, Delgado-Ruiz RA, Gómez-Moreno G, et al. (in press). "Role of mechanical compression on bone regeneration around a particulate bone graft material: an experimental study in rabbit calvaria". *Clinical Oral Implants Research*. April 2015. Vol. 12. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/clr.12592>).
15. Delgado-Ruiz RA, Romanos GE, Gerhke SA, et al. (in press). "Biological effects of compressive forces exerted on particulate bone grafts during socket preservation: animal study". *Clinical Oral Implants Research*. August 2016. Vol.2. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/clr.12942>).
16. Hämmerle CH, Schmid J, Lang NP, et al. "Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration". *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. February 1995. Vol.53-2. p.167-174. (doi: : [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(95\)90396-8](https://doi.org/10.1016/0278-2391(95)90396-8)).
17. Hämmerle CH, Schmid J, OlahAJ, et al. "A novel model system for the study of experimental bone formation in humans". *Clinical Oral Implants Research*. March 1996. Vol.7-1. p.38-47. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0501.1996.070105x>).
18. Schmid J, Wallkamm B, Hämmerle CH, et al. "The significance of angiogenesis in guided bone regeneration: a case report of a rabbit experiment". *Clinical Oral Implants Research*. June 1997. Vol.8-3. p.244-248. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0501.1997.080311.x>).
19. Glowacki J. "Angiogenesis in fracture repair". *Clinical Orthopaedics and Related Research*. October 1998. Vol.355-Suppl. p.82-89. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1097/00003086-199810001-00010>).
20. Padiál-Molina M, Galindo-Moreno P, Fernández-Barbero JE, et al. "Role of wettability and nanoroughness on interactions between osteoblast and modified silicon surfaces". *Acta Biomaterialia*. February 2011. Vol.7-2. P.771-778. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.024>).
21. Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. "Scores of Plaque, bleeding, suppuration and probing depth to predict probing attachment loss. 5 years of observation following nonsurgical periodontal therapy". *Journal of Clinical Periodontology*. February 1990. Vol.17-2. p.102-7. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.1990.tb01070.x>).
22. Claffey N, Nylund K, Kiger R, et al. "Diagnostic predictability of scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth for probing attachment loss. 3 ½ years of observation following initial periodontal therapy". *Journal of Clinical Periodontology*. February 1990. Vol.17-2. p.108-14. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.1990.tb01070.x>).
23. Grossi SG, Dunford RG, Ho A, et al. "Sources of error for periodontal probing measurements". *Journal of Periodontal Research*. July 1996. Vol.31-5. p.330-6. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.1996.tb00500.x>).
24. Jeffcoat MK, Jeffcoat RL, Jens SC, et al. "A new periodontal probe with automated cemento-enamel junction detection". *Journal of Clinical Periodontology*. April 1986. Vol.13-4. p.276-80. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.1986.tb02222.x>).
25. McCulloch CA, Birek P, Hardy V. "Comparison of gingival attachment level measurements with an automated periodontal probe and a pressure-sensitive probe". *Journal of Periodontal Research*. September 1987. Vol.22-5. p.348-52. (doi: : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.1987.tb01597.x>).
26. Pascual Aramburu JA, Lázaro Calvo PJ, Herrero Climent M. "Sondas electrónicas en periodoncia". *Periodoncia*. July-September 2003. Vol. 13-3. p.197-210.

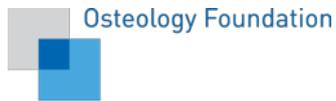


#### **9.4.2. Presentación de Poster Científico: International Osteology Symposium**

“Influence of the compaction force of bone graft particles during bone regeneration”.

**Viteri-Agustín, Iratxe**; Brizuela-Velasco, Aritza; Jiménez-Garrudo, Antonio; Chávarri-Prado, David; Pérez-Pevida, Esteban; Lou-Bonafonte, José Manuel.





Osteology Foundation | Landenbergstrasse 35 | CH-6002 Lucerne

Dr Iratxe Viteri

Lucerne, 04 June 2019

### **International Osteology Symposium Barcelona 2019 – Poster Confirmation**

To whom it may concern,

The Osteology Foundation promotes research, education and collaboration between universities and industry in the field of oral and maxillofacial tissue regeneration. The objective is to make new techniques and products available to practitioners quicker and with greater goal orientation.

To this end, the Osteology Foundation organised a symposium focusing on “THE NEXT **REGENERATION**” in the field of regenerative dental medicine on 25-27 April 2019 at the CCIB congress centre in Barcelona, Spain.

Dr Iratxe Viteri participated in this symposium by presenting a poster entitled “*Influence of the compaction force of bone graft particles during bone regeneration.*”, which was exhibited and presented during the 3-day symposium.

If you need any further information, please do not hesitate to contact me.

Yours respectfully,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Kristian Tersar".

Dr. Kristian Tersar  
Executive Director  
Osteology Foundation



### **9.4.3. Presentación Comunicación Oral: V International SCOI Congress**

Influencia de la fuerza de compactación del xenoinjerto particulado en la angiogénesis durante la regeneración ósea: estudio piloto.

**Viteri-Agustín, Iratxe**; Jiménez-Garrudo, Antonio; Brizuela-Velasco, Aritza; Chávarri-Prado, David; Diéguez-Pereira, Markel; Pérez-Pevida, Esteban; Montalbán-Vadillo, Oier; Lou-Bonafonte, José Manuel.





# V International scolcongress

**Influencia de la fuerza de compactación del  
xenoinjerto particulado en la angiogénesis durante  
la regeneración ósea: estudio piloto.**

**CERTIFICADO DE PRESENTACIÓN DE COMUNICACIÓN ORAL  
EN EL V SCOI CONGRESS, CON LOS SIGUIENTES AUTORES:**

Iratxe Viteri Agusifn, Antonio Jiménez Garrudo, Ariza Brizuela Velasco, David Chavarri Prado,  
Markel Diéguez Pereira, Esteban Pérez Pevida, Oier Montalbán Vadillo, José Manuel Lou Bonafonte.



**Ariza Brizuela Velasco**  
Presidente del Comité Organizador

**Bilbao. 22, 23 y 24 de febrero de 2018.**



**Bilbao 2018**  
Palacio Euskalduna



#### **9.4.4. Presentación Poster Científico: V International SCOI Congress**

Influencia del tamaño de particular en regeneración ósea guiada: una revisión sistemática.

Montalbán-Vadillo, Oier; **Viteri-Agustín, Iratxe**; Chávarri-Prado, David; Diéguez-Pereira, Markel; Pérez-Pevida, Esteban; Bellanco De La Pinta, Iker; Jiménez-Garrudo, Antonio; Brizuela-Velasco, Aritza; Fernández-González, Felipe José.





# V International Scoliosis Congress

## Influencia del tamaño de partícula en regeneración ósea guiada: una revisión sistemática.

CERTIFICADO DE PRESENTACIÓN DE COMUNICACIÓN TIPO PÓSTER  
EN EL V SCOI CONGRESS, CON LOS SIGUIENTES AUTORES:

Montalbán Vadillo, Oier; Viteri Agustín, Iratxe; Chávarri Prado, David; Diéguez Pereira, Markel,  
Pérez Pevida, Esteban; Bellanco De La Pinta, Iker; Jiménez Garrudo, Antonio;  
Brizuela Velasco, Aritza; Fernández González, Felipe José.



**Aritza Brizuela Velasco**  
Presidente del Comité Organizador

**Bilbao 2018**  
Palacio Euskalduna

**Bilbao, 22, 23 y 24 de febrero de 2018.**



#### **9.4.5. Publicación de Artículo: Revista “International Journal of Oral and Maxillofacial Implants”**

“*The impact of compaction force on graft consolidation in a guided bone regeneration model*” en la revista International Journal of Oral and Maxillofacial Implants que esta incluida en Science Citation Index y con un factor de impacto en 2020 de 2,320; (cuartil Q2).

**Viteri-Agustín I**, Brizuela-Velasco A, Lou-Bonafonte JM; Jiménez-Garrudo A, Chávarri-Prado D, Pérez-Pevida E, Benito-Garzón L, Gruber R. *The impact of compaction force on graft consolidation in a guided bone regeneration model*.



## The Impact of Compaction Force on Graft Consolidation in a Guided Bone Regeneration Model

Iratxe Viteri-Agustín, DDS<sup>1</sup>/Aritza Brizuela-Velasco, PhD<sup>2</sup>/Jose Manuel Lou-Bonafonte, PhD<sup>3</sup>/  
Antonio Jiménez-Garrudo, DDS<sup>4</sup>/David Chávarri-Prado, DDS<sup>2</sup>/Esteban Pérez-Pevida, PhD<sup>4</sup>/  
Lorena Benito-Garzón, PhD<sup>4</sup>/Reinhard Gruber, PhD<sup>5</sup>

**Purpose:** Compaction of particulated grafts is done manually; thus, the effect of compression force on bone regeneration remains unclear. The aim of this study was to evaluate the impact of two different compression forces on the consolidation of particulated bovine hydroxyapatite. **Materials and Methods:** Two titanium cylinders were fixed on the calvarium of eight New Zealand rabbits. Both defects were filled with particulated bovine hydroxyapatite subjected to a compression force of 0.7 kg/cm<sup>2</sup> or 1.6 kg/cm<sup>2</sup> before being covered with a resorbable collagen membrane. A handheld device that uses a spring to control the compression force applied by the plugger was used. At 6 weeks, histomorphometry of the area immediately adjacent to the calvaria bone and to the collagen membrane was performed. **Results:** It was shown that next to the calvaria, the bone volume per tissue volume (BV/TV) was 29.0% ± 8.8% and 27.6% ± 8.2% at low and high compression force, respectively; the bone-to-biomaterial contact (BBC) was 58.2% ± 25.0% and 69.3% ± 22.9%, respectively ( $P > .05$ ). In the corresponding area next to the collagen membrane, BV/TV was 4.9% ± 5.1% and 5.7% ± 4.7%, and the BBC was 18.3% ± 20.8% and 20.1% ± 15.9%, respectively ( $P > .05$ ). In addition, the number and area of blood vessels were not significantly affected by compression force. **Conclusion:** Both compression forces applied resulted in similar consolidation of bovine hydroxyapatite expressed by new bone formation and vascularization based on a rabbit calvaria augmentation model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2020;35:917–923. doi: 10.11607/jomi.8082

**Keywords:** bone regeneration, compaction, compression force, particulated bone graft

Tooth loss initiates catabolic events that result in alveolar bone resorption.<sup>1</sup> Bone atrophy posing a challenge for placement of implants<sup>2,3</sup> can be compensated by augmentation procedures.<sup>4</sup> Guided bone regeneration (GBR) is among the major techniques for increasing bone volume<sup>1</sup> and has been best documented for the treatment of jawbone defects.<sup>5,6</sup> GBR is based on a fundamental principle that a membrane serves as a barrier to separate the epithelial and connective tissue from the augmented bone that is usually a defect filled with particulated grafts.

Particulated grafts are osteoconductive, allowing new bone that originates from the defect margins to grow on the graft surface and into the empty void space. Blood capillaries sprout into the void space, thereby delivering perivascular cells that differentiate into bone-forming osteoblasts.<sup>7,8</sup> The ideal void space for intramembranous ossification has the dimension of an osteon.<sup>9,10</sup> It is mainly the compression force together with the friction between the particles that defines the void space and thus the osteoconductive properties of a particulated graft.

Apart from compaction, brittle grafts can fracture, and the dust can clog the void volume required for angiogenesis. Thus, overcompaction might impair bone formation and consequently graft consolidation.<sup>8,11,12</sup> Compaction, however, reduces micromovements of particulated grafts,<sup>13,14</sup> allowing the sprouting of blood capillaries required for bone regeneration.<sup>15</sup> Condensation of grafts is usually done manually based on experience without knowing the compression force applied.

Recent research revealed that compression force can affect bone formation<sup>16–18</sup> and graft consolidation in extraction sockets.<sup>17,18</sup> Nevertheless, compression force remains poorly defined and varies among studies. Moreover, the clinical applicability of how the compression force is applied is low. The objective of this study was therefore to evaluate the consolidation of particulated bovine hydroxyapatite using two

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Physiology, School of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.

<sup>2</sup>Department of Surgery and Surgical Specialties, School of Medicine and Health Sciences, University of Oviedo, Oviedo, Spain.

<sup>3</sup>Department of Pharmacology and Physiology, School of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; Institute of Health Research of Aragón, Spain.

<sup>4</sup>Department of Surgery, School of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

<sup>5</sup>Department of Oral Biology, School of Dentistry, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

**Correspondence to:** Dr Iratxe Viteri Agustín, Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Medicina, Edificio A. Universidad de Zaragoza, 50009, Spain. Email: iratxeviteri13@gmail.com

Submitted September 19, 2019; accepted April 23, 2020.  
©2020 by Quintessence Publishing Co Inc.



**Figs 1a to 1c** Illustration of the surgical protocol. (a) Incision of approximately 4.5 mm was made in the medial zone of the head; after full-thickness flap, (b) two partial osteotomies were performed and cylinders were inserted and (c) fixed with the help of pins in the partial osteotomies.

defined compression forces commonly used in clinical practice,<sup>19</sup> taking into account the usual tip diameter of hand instruments,<sup>19</sup> on bone formation in a GBR model. The findings presented here provide the scientific basis for the *in vivo* use of a handheld device that uses a spring to control the compression force applied by the plugger.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics, Animals, and Anesthesia

The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Center, Cáceres, Spain (Ref: 003/18), and authorized by the Regional Government of Extremadura (case number: 20180216). The study was conducted in the Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Center (REGA: ES 100370001499) by personnel with experience and qualifications for the management of experimental animals. The reporting follows the ARRIVE guidelines<sup>20</sup> to adequately communicate these findings.

Eight male 5-month-old New Zealand rabbits with an average weight of 6.1 kg (5.8 to 6.4 kg) had completed an acclimation period of 21 days at 20°C to 24°C, 55% humidity with 15 air exchanges per hour, light-dark cycle of 12-12 hours, without excessive noise, and were fed a standardized diet with water *ad libitum*. Each animal remained in an individual cage 40 cm high and 4,670 cm<sup>2</sup> in area and with an elevated platform that allowed the animal to hide. For surgery, rabbits were premedicated by administering intramuscular medetomidine 0.8 mg/kg (Domtor, Pfizer) and intramuscular ketamine 5 mg/kg (Ketolar, Pfizer). Anesthesia was induced with intravenous propofol 4 mg/kg (Diprivan, Zeneca Pharmaceuticals). Anesthetic maintenance was performed by inhalation anesthesia with sevoflurane (Sevorane, Abbott Laboratories) at a fixed concentration in the vaporizer of 1.1% to 1.2%. In addition, local anesthetic was placed using articaine hydrochloride via an infiltrative route in the operated area (Ultracain

with epinephrine 40/0.01 mg/mL, solution for injection, Laboratorios Normon).

### Surgical Protocol

After shaving and disinfecting the skin of each head with povidone-iodine, a medial 4.5-cm incision was made, and a mucoperiosteal flap was elevated, exposing the bones of the calvarium (Fig 1a). Two standardized circular osteotomies were performed (0.5-mm deep with an 8-mm outer diameter), one in each parietal bone on both sides of the sagittal suture. A trephine drill with a depth stop was used for this purpose, as well as profuse irrigation with saline solution, keeping the inner cortex of the cranial bone intact. The external cortex was removed with a round tungsten carbide drill (HM141F 031, Meisinger). With the help of pins (Master-Pin-Control Bone Management, Meisinger), cylinders with an area in the base of 37.4 mm<sup>2</sup>, 6.9 mm in inner diameter, and 4.0 mm in height (Soadco) were fixed (Figs 1b and 1c). Both defects were filled with 0.13 ± 0.01 g of small particle size (500 to 1,000 μm) hydroxyapatite of bovine origin (Cerabone, Botiss Biomaterials) equilibrated with 1 mL of saline solution. The material was weighed using a precision scale (SBS-LW-2000A 2000g, Steinberg Systems).

### Compression Force and GBR

Subsequently, the graft was compressed with five compressions at 0.7 kg/cm<sup>2</sup> in the right parietal defect and with five compressions at 1.6 kg/cm<sup>2</sup> in the left defect (Figs 1d and 1e). A handheld compression device developed specifically for this line of research was used.<sup>19</sup> The compression device has a tip of 3.9 mm and works at a force between 0 and 1.6 kg/cm<sup>2</sup>, which was calibrated by an independent company (AC6 Metrología). Both defects were covered with a 30 × 40-mm resorbable porcine pericardial membrane (Jason membrane, Botiss Biomaterials) and layer-sutured (Vicryl 4-0 Ethicon, Johnson & Johnson International; Fig 1f). At the end of the surgery, the animals were administered subcutaneous antibiotic therapy (Enrofloxacin, Baytril,



**Figs 1d to 1f** (d) Particulate biomaterial was compressed by five compressions at  $0.7 \text{ kg/cm}^2$  and  $1.6 \text{ kg/cm}^2$ , and (e) once both defects were filled with  $0.13 \pm 0.01 \text{ g}$  of particulate xenograft compressed at a standardized force, (f) a porcine pericardial membrane was placed on the grafted areas.

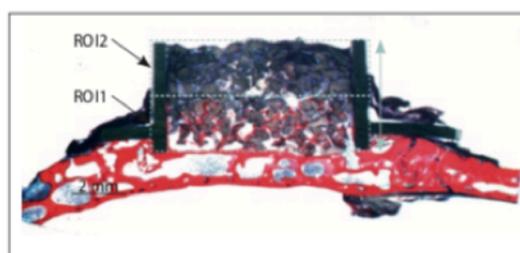
Bayer Hispania;  $10 \text{ mg/kg/12 hours}$  for 5 days) and analgesia (Buprenorphine, Buprenex, RB Pharmaceuticals Limited;  $0.05 \text{ mg/kg/8 hours}$  for 3 days). Animals were observed to rule out possible symptoms and signs of pain, fever, and infection. At 6 weeks after surgery, rabbits were sacrificed by intravenous injection of potassium chloride (Braun Medical;  $1$  to  $2 \text{ mmol/kg}$ ) under general anesthesia.

#### Preparation of Specimens and Histomorphometric Analysis

The bone segments containing the cylinders were fixed and dehydrated in an increasing ethanol gradient before being polymerized in methyl methacrylate. Samples were sectioned in the central region of the cylinder (IsoMet Low Speed, Buehler), and  $100\text{-}\mu\text{m}$  sections were stained with Stevenel's blue. Their histologic evaluation was performed using a light microscope (Nikon Eclipse 90i, Nikon Instruments) coupled with a camera (Nikon Digital Sight DS-SMC, Nikon Instruments). The histomorphometric analysis was performed with Meta Imaging Series 6.1 software (MetaMorph, Molecular Devices). The region of interest (ROI) measured  $6.9 \text{ mm}$  in width  $\times$   $2.0 \text{ mm}$  in height. Region of interest 1 (ROI1) refers to the zone that covers the  $2.0 \text{ mm}$  of the defect closest to the calvaria or native parietal bone, and region of interest 2 (ROI2) refers to the upper  $2.0 \text{ mm}$  of the defect, the farthest from the calvaria (Fig 2).

The following variables were analyzed:

- Percentage bone volume/tissue volume (BV/TV): Percentage of new mineralized bone tissue formed with respect to the total area of each ROI.
- Contact percentage between the new bone and biomaterial particles (BBC): Percentage of the particles present in each ROI in direct contact with the new bone formed, corresponding to the percentage of osseointegration.



**Fig 2** Image representing both regions of interest (ROI). ROI1 represents the region of the defect closest to the calvaria or native parietal bone ( $6.9 \times 2 \text{ mm}$ ), and ROI2 represents the defect region farthest from the calvaria, next to the collagen membrane ( $6.9 \times 2 \text{ mm}$ ). Greater bone formation and greater integration of the material in the portion immediately adjacent to the calvaria (ROI1) makes sense since the new vessels and cells for bone formation originate exclusively in the calvarium. Staining: Stevenel's blue. Scale bar =  $2 \text{ mm}$ .

- Number of blood vessels and their area in the ROI: Vessels were quantified after scanning the section at  $10\times$  magnification. For the selection of vessels, only those showing a lumen were quantified.

#### Statistical Analysis

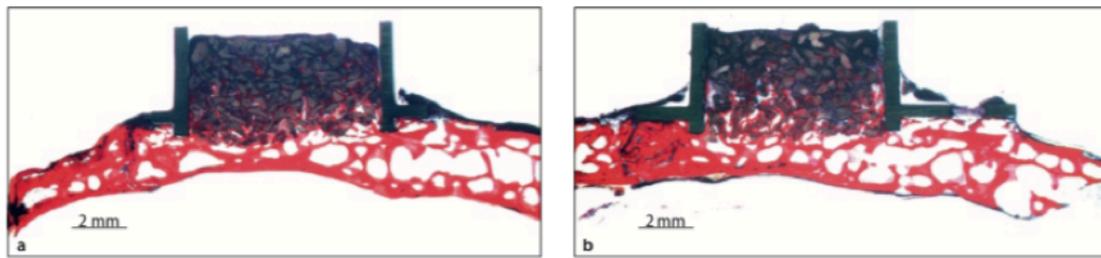
The results were collected and analyzed using GraphPad Prism Version 7.00 software for Windows (GraphPad Software). Because of the small sample size, nonparametric tests were used. For the comparison between the two study groups and the ROIs, the Wilcoxon signed-rank test was selected. Differences were considered significant if the  $P$  value was  $< .05$ .

## RESULTS

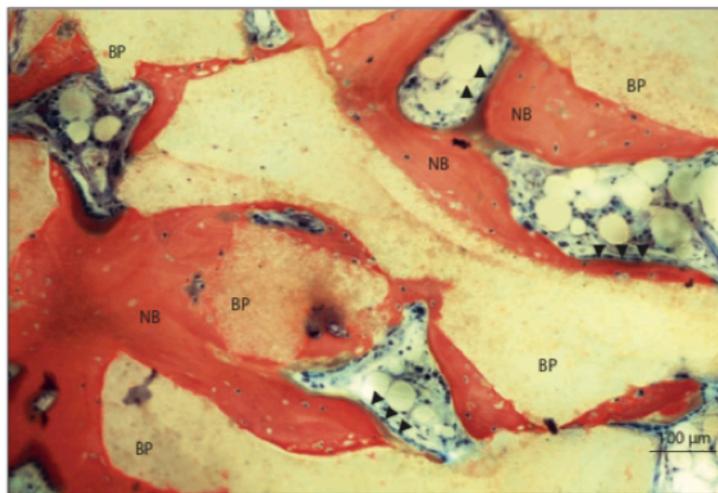
#### Surgical Complications

There were no surgical complications during placement of the cylinders. All animals healed well, with no signs of pain, fever, or infection. Histology showed no signs of inflammation, tissue necrosis, or infection. All the cylinders were intact and well-fixed in their original

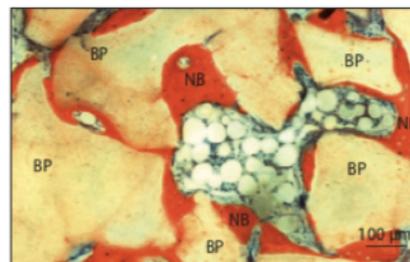
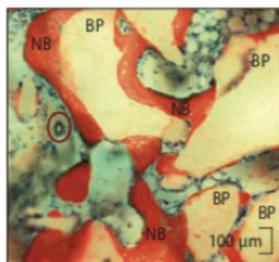
Viteri-Agustín et al



**Fig 3** Histologic images taken with an optical microscope that detail the titanium cylinders with the fillings placed with different forces and tested at 6 weeks of healing. (a) The defect on the left corresponds to the area where the greatest compression force was applied ( $1.6 \text{ kg/cm}^2$ ), and (b) the defect on the right corresponds to the area where a lower compression force ( $0.7 \text{ kg/cm}^2$ ) was applied; both defects are in the same animal. In the sections, the cylinders are perfectly adapted and fixed in their original position. Staining: Stevenel's blue. Scale bar = 2 mm.



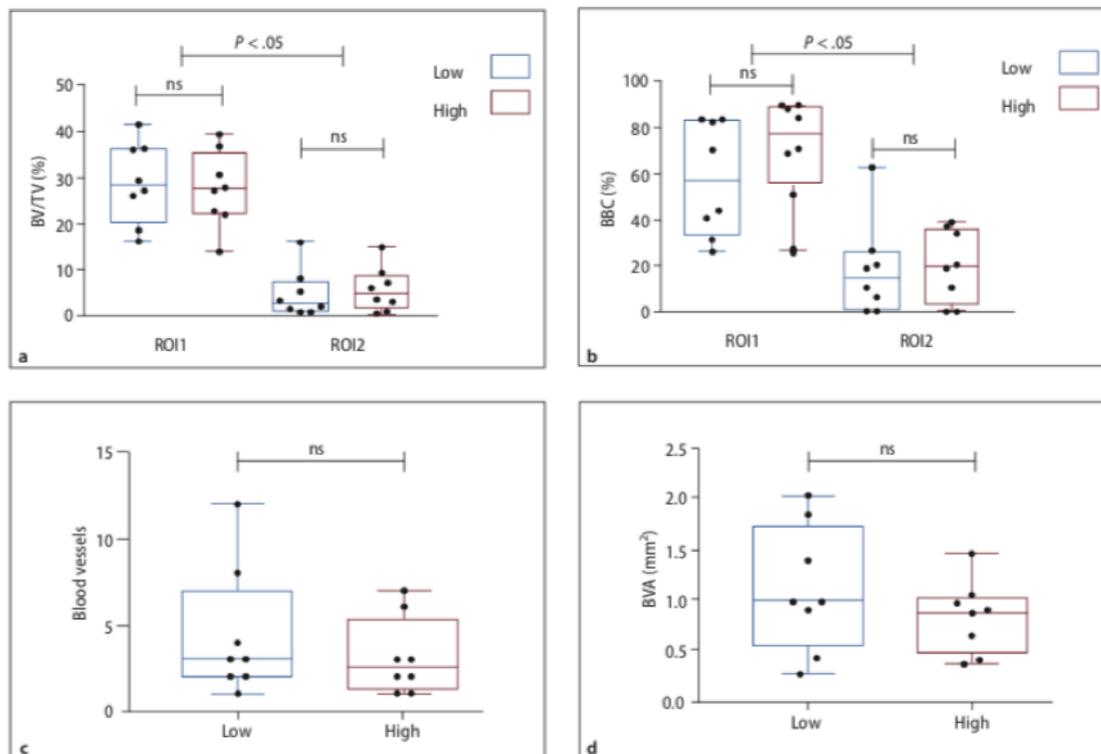
**Fig 4** Histologic section of the cylinders after 6 weeks of healing (higher magnification). Trabecular bone neof ormation process was appreciated. Direct contact of the new bone with particulate biomaterial was observed, showing adequate integration. Mature osteocytes could be observed in the newly formed bone. Osteoid associated with osteoblast lines were present at bone surface. Adipose and hematopoietic bone marrow was developed. Bone marrow was vascularized. NB = new bone; BP = biomaterial particle. The black arrows indicate the osteoblast lines forming osteoid, and the circles indicate blood vessels. Staining: Stevenel's blue, in which the mineralized bone appears red. Scale bar = 100 µm.



position (Fig 3). Varying degrees of bone regeneration were obtained in all cylinders. Specimens showed integration of the bone graft with the newly formed bone originating from the native parietal bone. Bone formation was also observed on the surface of the titanium cylinders. The results for the variables are depicted in Figs 4 and 5 and are described as follows.

#### New Bone Formation Indicated as Bone Volume Per Tissue Volume

Regenerated bone presented a mature mineralized trabecular appearance. Osteoid borders on the bone surface indicate active bone synthesis. In ROI1 next to the calvaria, bone formation indicated as BV/TV with a lower compression force was  $29.0\% \pm 8.8\%$ , and that with a higher compression force was  $27.6\% \pm 8.2\%$ . The



**Fig 5** Histomorphometric measurements of each parameter after 6 weeks of healing, represented in box plots. (a) Percentage of bone volume/tissue volume (BV/TV). (b) Percentage of bone-biomaterial contact (BBC). (c) Number of blood vessels. (d) Blood vessel area (BVA). The points show the data for all specimens. The median, percentiles, and maximum and minimum values of each group and outliers can be observed. ns = not significant.

difference between the two compression forces was not statistically significant ( $P = .844$ ). In ROI2 next to the collagen membrane, bone formation with a lower compression force was  $4.9\% \pm 5.1\%$ , and that with a higher compression force was  $5.7\% \pm 4.7\%$ . The results were similar in both cases ( $P = .844$ ). ROI1 showed higher new bone formation values than ROI2, resulting in statistically significant differences ( $P = .008$ ).

#### Bone-to-Biomaterial Contact

The bone graft was completely osseointegrated, ie, surrounded by mature bone with the presence of mature osteocytes. In areas of partial osseointegration, the non-osseointegrated surface presented cell colonization, which in some cases were multinucleated cells. In ROI1, a mean contact of  $58.2\% \pm 25.0\%$  was observed with a lower compression force, and a mean contact of  $69.3\% \pm 22.9\%$  was observed with a higher compression force. Compression forces showed no statistically significant differences ( $P = .195$ ). In ROI2, a mean contact of  $18.3\% \pm 20.8\%$  was observed with a lower compression force,

and a mean contact of  $20.1\% \pm 15.9\%$  was observed with a higher compression force. No statistically significant differences were found between the two compression forces ( $P = .625$ ). The BBC values were therefore higher in ROI1 than in ROI2, and these differences were statistically significant ( $P = .008$ ).

#### Vascularization

In ROI1 next to the calvaria,  $4.4 \pm 3.7$  blood vessels were observed with a lower compression force, and there were  $3.1 \pm 2.2$  blood vessels in defects with a greater compression force ( $P = .297$ ). Blood vessels were considered present in bone marrow when they originated from the vascularization of the bone marrow and vessels, forming osteons that were generated from preexisting vessels. In ROI2 next to the collagen membrane, non-mineralized tissue had greater formation of irregular, sinuous, or oblique vessels. The mean blood-vessel area was  $1.1 \pm 0.6$  mm<sup>2</sup> with a lower compression force and  $0.8 \pm 0.4$  mm<sup>2</sup> with a higher compression force ( $P = .148$ ).

## DISCUSSION

There is demand for standardized compression force reflecting the routine use of traditional manual instruments. On the one hand, a high compression force is expected to fracture brittle particles and thereby reduce the void spaces required for the sprouting of new blood capillaries.<sup>8,11,12</sup> Osteoblast precursors move into developing and fracturing bones along with invading blood vessels.<sup>21</sup> The growth of blood vessels in bone and osteogenesis are coupled.<sup>22,23</sup> On the other hand, a low compression force could result in a smaller surface area of biomaterial for cell apposition. The larger void space between particles could also allow micromovements that could hinder bone regeneration<sup>24,25</sup> in favor of fibrous connective tissue formation as observed around dental implants.<sup>26,27</sup> Based on this clinical demand and scientific background, this preclinical study was performed. The innovative aspect of this research was based on the *in vivo* use of a handheld device that resembles the traditional plugger; however, here, compression force was controlled by a spring. The compression forces were selected based on a previous study carried out with eight experienced oral surgeons.<sup>19</sup>

The present study shows that application of pressures between 0.7 and 1.6 kg/cm<sup>2</sup> onto a particulated bone substitute allowed similar bone formation in a one-wall rabbit calvaria augmentation model. As expected,<sup>28</sup> bone formation was higher in ROI1 next to the calvaria with approximately 30% BV/TV compared with ROI2 next to the collagen membrane showing approximately 5% BV/TV after a 6-week healing period using hydroxyapatite of bovine origin. Consistently, in the ROI1, approximately 60% to 70% of the biomaterial was covered by bone, suggesting good osseointegration of the particles. The number and area of blood vessels were also not considerably affected by the two compression forces. These findings relate to those of other studies, even though the ROI, the biomaterials used, and the observation periods are different. For example, augmentation with deproteinized bovine bone showed approximately 10% BV/TV after 4 weeks<sup>29,30</sup> and approximately 40% BV/TV after 8 weeks<sup>31</sup> in a comparable rabbit augmentation model. Taken together, these findings suggest that the application of a pressure between 0.7 and 1.6 kg/cm<sup>2</sup> to condense particulated hydroxyapatite of bovine origin allows comparable graft consolidation in a rabbit calvaria augmentation model. The clinical relevance should be interpreted with caution, but it is likely that the indicated range of compression forces to condense the particulated bovine hydroxyapatite is suitable to allow graft consolidation. This research opens the path to clinical application of handheld instruments to control compression force in augmentation procedures.

The results of this study add to the findings on the role of compression force on the consolidation of particulate biomaterial.<sup>16–18</sup> Romanos et al<sup>16</sup> showed significantly better defect closure and more bone formation when using 8.2 g (< 0.029 kg/cm<sup>2</sup>) vs 4.1 g in rabbit calvaria defects. To compress the biomaterial, they used coins wrapped in aluminum foil with a diameter that exceeds the 6-mm defect margin. Delgado-Ruiz et al,<sup>17</sup> in a model of alveolar preservation in dogs, used standardized calibrated weights (10, 50, and 200 g) placed on the condenser with 4.0-mm diameter to exert compression force of approximately 0.1 to 1.6 kg/cm<sup>2</sup>. They reported that higher compression forces facilitate the distribution of the particulate graft into the alveolus and bone formation. Finally, Cho et al<sup>18</sup> evaluated the compression force of 1.8 to 10.8 kg/cm<sup>2</sup> in alveolar preservation under clinical conditions. This calculation was based on a force of 5 N and 30 N on 6-mm diameter. The application of a greater compression force significantly enhanced new bone formation. Overall, the findings of previous studies are difficult to compare with the findings of the present study due to the different models, clinical situations, compression forces, modes of application, and biomaterials used. Obviously, there is a demand for future research to refine the ideal compression force at a certain biomaterial respecting the clinical indication.

There are a few study limitations. First, the compression force expressed by kg/cm<sup>2</sup> is not clearly defined, as it lacks the factor time that would give compaction pressure. Five pushes were used with the handheld instrument. This was necessary because the dimension of the plugger was smaller than the dimension of the augmented surface. Moreover, it remains the decision of the surgeon how long each push takes. Thus, future research should consider a plugger matching the surface of the augmented area and the time the force is applied. Second, the findings presented here are restricted to one selected granular biomaterial. The findings should not be extrapolated for other biomaterials, as brittleness, shape, or any other property could influence the different reorganization of the particles during compression. Third, this was a pilot study, and the sample was small. Finally, the cylinder model did not necessarily represent the clinical situation considering the different anatomical locations and the lack of biomechanical challenge caused by the masticatory system. Moreover, the model is vertical and not self-contained in the bone bed, which seriously hinders bone formation in the outer area of interest. Taking these limitations into account, the findings presented here are a primer for future research to evaluate the impact of a wider range of compression forces on graft consolidation, also considering other commercially available particulated biomaterials.

## CONCLUSIONS

This research evaluated a handheld device where a clinically practicable compression force is controlled by a spring. Both compression forces applied resulted in similar consolidation of bovine hydroxyapatite as expressed by new bone formation and vascularization. It was concluded that application of compression forces in the range of 0.7 to 1.6 kg/cm<sup>2</sup> allows consolidation of bovine hydroxyapatite in a rabbit calvaria augmentation model.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research did not receive funding from any specific grant. The authors are grateful to Klockner S. A. Company and Botiss Biomaterials Company for providing the Cerabone (Botiss Biomaterials), the Jason membrane (Botiss Biomaterials), and the titanium cylinders (Soadco). The authors declared no conflicts of interest related to this study.

## REFERENCES

- Fu JH, Wang HL. Horizontal bone augmentation: The decision tree. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31:429–436.
- Nishioka RS, Souza FA. Bone spreading and standardized dilation of horizontally resorbed bone: Technical considerations. *Implant Dent* 2009;18:119–125.
- Santagata M, Guariniello L, D'Andrea A, Tartaro G. A modified crestal ridge expansion technique for immediate placement of implants: A report of three cases. *J Oral Implantol* 2008;34:319–324.
- Bosshardt DD, Schenk RK. Principios biológicos de la regeneración ósea. In: Buser D (ed). *20 Años de Regeneración Ósea Guiada en Implantología Oral*. Barcelona: Quintessence, 2012:15–45.
- Benic GI, Hammerle CHF. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol* 2000 2014;66:13–40.
- Turri A, Elgali I, Vazirani F, et al. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. *Biomaterials* 2016;84:167–183.
- Hammerle CHF, Jung RE. Procedimientos de aumentación del reborde alveolar. In: Lindhe J, Lang NP (eds). *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*, ed 5. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009:1083–1098.
- Jensen SS, Bosshardt DD, Buser D. Injertos óseos y materiales de sustitución ósea. In: Buser D (ed). *20 Años de Regeneración Ósea Guiada en Implantología Oral*. Barcelona: Quintessence, 2012:71–96.
- Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res* 1970;4:433–456.
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26:5474–5491.
- Krauser JT, Schettrich A. Implant site development: Socket preservation. In: Sonick M, Hwang D (eds). *Implant Site Development*. Sussex: John Wiley & Sons, 2012:121–135.
- Lin S. Sinus augmentation with immediate implant insertion: A case report. *J Implant Adv Clin Dent* 2013;5:42–45.
- Brugnami F, Mellonig JT. Treatment of a large periapical lesion with loss of labial cortical plate using GTR: A case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999;19:243–249.
- Brugnami F, Then PR, Moroi H, Kabani S, Leone CW. GBR in human extraction sockets and ridge defects prior to implant placement: Clinical results and histologic evidence of osteoblastic and osteoclastic activities in DFDBA. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999;19:259–267.
- Doi K, Kubo T, Makihara Y, et al. Osseointegration aspects of placed implant in bone reconstruction with newly developed block-type interconnected porous calcium hydroxyapatite. *J Appl Oral Sci* 2016;24:325–331.
- Romanos GE, Delgado-Ruiz RA, Gómez-Moreno G, López-López PJ, Mate Sánchez de Val JE, Calvo-Guirado JL. Role of mechanical compression on bone regeneration around a particulate bone graft material: An experimental study in rabbit calvaria. *Clin Oral Implants Res* 2018;29:612–619.
- Delgado-Ruiz R, Romanos GE, Alexandre Gerhke S, Gomez-Moreno G, Maté-Sánchez de Val JE, Calvo-Guirado JL. Biological effects of compressive forces exerted on particulate bone grafts during socket preservation: Animal study. *Clin Oral Implants Res* 2018;29:792–801.
- Cho IW, Park JC, Shin HS. A comparison of different compressive forces on graft materials during alveolar ridge preservation. *J Periodontal Implant Sci* 2017;47:51–63.
- Brizuela-Velasco A, Jiménez-Garrudo A, Viteri-Agustín I, et al. Design of a precision compactor for use in guided bone regeneration in the area of oral surgery. *Dyna* 2019;94:53–58.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 2010;1:94–99.
- Maes C, Kobayashi T, Selig MK, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 2010;19:329–344.
- Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 2014;507:323–328.
- Wu S, Xu X, Sun J, Zhang Y, Shi J, Xu T. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates traumatic vertebral fracture healing by coupling proliferation of type H microvessels. *J Ultrasound Med* 2018;37:1733–1742.
- Goodman SB. The effects of micromotion and particulate materials on tissue differentiation: Bone chamber studies in rabbits. *Acta Orthop* 1994;258:1–43.
- Betts DC, Müller R. Mechanical regulation of bone regeneration: Theories, models, and experiments. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:211.
- Szmukler-Moncler S, Salama H, Reingewirtz Y, Dubruille JH. Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: Review of experimental literature. *J Biomed Mater Res* 1998;43:192–203.
- de Barros E Lima Bueno R, Dias AP, Ponce KJ, Wazen R, Brunski JB, Nanci A. Bone healing response in cyclically loaded implants: Comparing zero, one, and two loading sessions per day. *J Mech Behav Biomed Mater* 2018;85:152–161.
- Busenlechner D, Huber CD, Vasak C, Dobsak A, Gruber R, Watzek G. Sinus augmentation analysis revised: The gradient of graft consolidation. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1078–1083.
- Torres J, Tamimi FM, Tresguerres IF, et al. Effect of solely applied platelet-rich plasma on osseous regeneration compared to Bio-Oss: A morphometric and densitometric study on rabbit calvaria. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10:106–112.
- Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvaria: Comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol* 2006;33:922–928.
- de Mello e Oliveira R, Pelegrine AA, Aloise AC, Ferreira LM. Xenograft impregnated with bone marrow mononuclear fraction for appositional bone regeneration in rabbit calvaria: A clinical and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29:962–968.



