



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

TESIS DE MAGISTER

**“SULFATO DE CALCIO EN REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA.
Estudio comparativo de su uso solo o enriquecido con minerales”**

Realizada en la Facultad de Odontología de la Universidad
Nacional de La Plata durante el periodo 2005-2007

**MAESTRANDO:
OD. MARIANO LOPEZ**

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

**CO -DIRECTOR:
MG. CESAR LUCHETTI**

2008

**“SULFATO DE CALCIO EN REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA.
Estudio comparativo de su uso solo o enriquecido con minerales”**

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es desarrollar y evaluar un biomaterial para regeneración ósea a base de Sulfato de Calcio enriquecido con minerales. Se utilizaron 30 ratas macho, de cepa Fisher, originarias del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, y producidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, endocriadas, libres de patógenos específicos (SPF), de 16 semanas de edad y de 500 gramos de peso. Los animales fueron divididos en 3 grupos de 10 cada uno, manteniéndose durante 48 hs en condiciones ambientales convencionales: Temperatura 23 +/- 1 grados centígrados, humedad 50/55 %, iluminación 12 hs luz/ Hs oscuridad, con alimento balanceado comercial y agua autoclavada ad libitum. Dos horas antes de la intervención quirúrgica se les retiró el alimento, manteniéndolos con dieta líquida.

Todas fueron operadas bajo anestesia general con Ketamina/ Xilacina 75 mg/ kg + 10 mg/ kg por vía IM. Se realizaron 3 perforaciones de 9 mm de largo, por 3 mm de ancho y 3 mm de profundidad. Al Grupo 1 se le injertó partículas de Sulfato de Calcio, al Grupo 2 partículas de Sulfato de Calcio enriquecido con minerales, y el Grupo 3 sin tratamiento, quedando como control.

Durante el postoperatorio los animales permanecieron alojados bajo observación en el pabellón de animales de experimentación de la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

Como complemento recibieron en el postoperatorio Ácido Acetil salicílico y alimento balanceado.

A los 30 días los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono y se prepararon las muestras para microscopia. Las mismas fueron digitalizadas y se evaluó la superficie de hueso regenerado, dentro del defecto. Los distintos elementos de la imagen histológica fueron segmentados en base al color de la tinción (H.E) y posteriormente calculada su superficie mediante un analizador digital de imágenes.

El modelo experimental no ha presentado inconvenientes en su ejecución. Los sustitutos utilizados presentaron una consistencia blanda, fácil de manipular y mostraron buena tolerancia sin observarse respuestas adversas en ningunos de los casos.

Macroscópicamente en el grupo 2, se pudo determinar la formación completa del defecto óseo, notándose la presencia de partículas del injerto en el mismo. En el grupo 1, se observó una formación incompleta, en grados variables, y escasos restos del injerto, aparentemente por una reabsorción muy veloz. En el grupo 3, no se produjo regeneración, quedando una amplia cavidad residual.

Microscópicamente, en ambos grupos experimentales, no se observan reacciones inflamatorias importantes, ni signos de encapsulamiento fibroso del material, lo cual lo sitúa como biocompatible. Asimismo, en el grupo 2, histológicamente se observa la regeneración completa de los defectos, con formación de trabéculas de grosores variables e interconectividad entre las mismas. La superficie regenerada, en mm^2 para el grupo 1 fue de 9,270 (0,378), para el grupo 2 de 10,865 (0,358) y para el grupo 3 de 4.370 (0,549). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la superficie regenerada en el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($P = 0,022$).

Dentro de los límites de este estudio, podemos concluir que el material desarrollado es bien tolerado y posibilita la regeneración completa de un defecto crítico cuando fue tratado con Sulfato de Calcio enriquecido con minerales.

Pruebas clínicas son necesarias para una mejor comprensión de su posible utilización como sustituto óseo.

INTRODUCCION

Regenerar el hueso perdido ha sido desde tiempo atrás objeto de muchos estudios. En el campo de la odontología, a partir del desarrollo de la implantología es que comenzaron a realizarse cada vez más estudios con respecto a este tema, debido a la falta, en muchas ocasiones, de hueso disponible para colocar implantes.

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

Con este fin se han utilizado diversos materiales y técnicas. Dentro de ellos están las membranas, que actúan como una barrera para mantener el volumen de los defectos del hueso, aislándolo a su vez del tejido conjuntivo.

No obstante, cuando el defecto óseo a tratar es muy grande, o bien no es favorable, es necesario realizar injertos de hueso para ganar el volumen perdido. El uso de hueso del mismo paciente ha sido probado, y es elegido como primera opción para estos procedimientos, aunque conlleva una cirugía adicional para tomar el hueso a injertar, usualmente de la zona del mentón, trigono retromolar, tuberosidad del maxilar o, menos frecuentemente, de calota craneana o cresta ilíaca, dependiendo de la cantidad necesaria. Muchas veces para los pacientes esta cirugía adicional es muy traumática. Para evitar este problema, se han propuesto aloinjertos (hueso humano procesado en diferentes formas), xenoinjertos (por ej. hueso bovino), o material aloplásticos a base fosfato de calcio.

En trabajos previos de nuestro grupo se evaluó un sustituto óseo sintético a base de sulfato de calcio, con resultados preliminares alentadores,

aunque con una velocidad de reabsorción relativamente lenta. Esto último podría solucionarse generando partículas de menor tamaño y mayor porosidad.

Por otra parte, el hueso presenta una gran cantidad de minerales, que podrían combinarse dentro de un sustituto sintético para mejorar la mineralización del hueso neoformado, aunque esto no ha sido evaluado aún.

MARCO TEORICO

I. TEJIDO OSEO (ESTRUCTURA Y BIOLOGIA)

El tejido óseo representa la parte más importante del esqueleto. Es una forma especializada de tejido conectivo denso cuyas funciones son: protección, al rodear el cerebro y la medula espinal, y parte de los órganos del tórax y el abdomen de una coraza protectora; y participar en el mantenimiento de la homeostasis mineral.

1. OSTEOGENESIS (ORIGEN)

La osificación significa formación de tejido óseo, y siempre se produce al diferenciarse células indiferenciadas (células mesenquimáticas), que sintetizan y secretan matriz ósea orgánica, la cual al poco tiempo sufre calcificación.

El desarrollo embrionario de los huesos u osteogénesis se diferencia entre dos formas de osificación, la intramembranosa y la endocondral.

La osificación intramembranosa es cuando el hueso se produce directamente en el tejido conectivo primitivo del feto, y la osificación endocondral, se produce a partir de un molde preformado de cartílago. (Fig. 1).

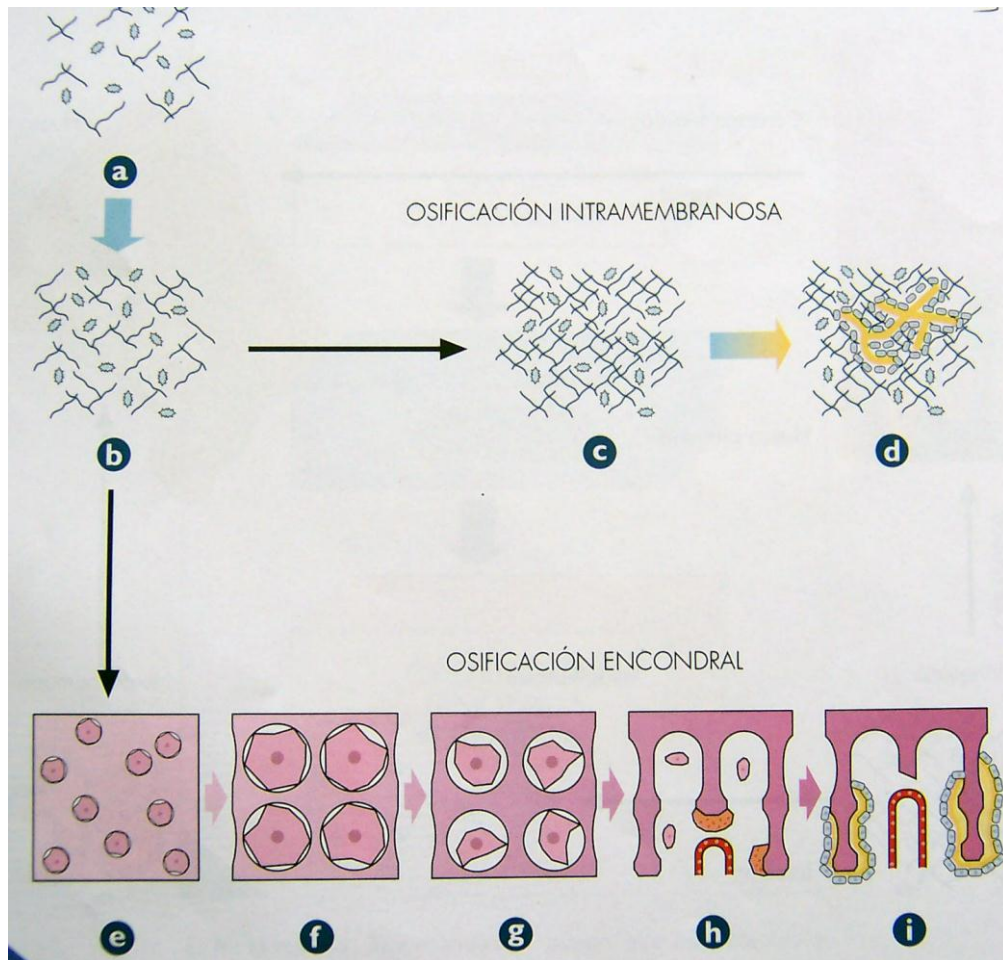


Fig. 1. **Osteogénesis**. El esquema refleja los principales procesos de dos diferentes tipos de osificación: **a.** Mesénquima; **b.** Mesénquima con aumento de densidad; **c.** Esbozo de tejido fibroso; **d.** Osteogénesis; **e.** Esbozo de cartílago hialino; **f.** Cartílago hipertrófico; **g.** Cartílago calcificado; **h.** Condrolisis; **i.** Osteogénesis.

1.1. OSIFICACION INTRAMEMBRANOSA

Los huesos planos del cráneo, partes del maxilar inferior y la mayor parte de la mandíbula (excepto el cóndilo) se forman por osificación intramembranosa y se denominan huesos mesenquimáticos.

Se denomina osificación intramembranosa debido a que la formación de los huesos comienza dentro de una placa densa mesenquimática, membranosa. Esta condensación del mesénquima se produce por división activa de las células mesenquimáticas y su condensación en un tejido conectivo ricamente vascularizado. Las células mesenquimáticas se diferencian a osteoblastos, que poco después secretan la matriz ósea orgánica. Esta matriz sin calcificar se llama osteoide y esta compuesta de proteoglucanos y fibras de colágeno para luego sufrir, una rápida calcificación por el depósito de fosfato de calcio.

El centro de osificación crece en tamaño donde quedan incluidos los osteoblastos circundantes y se transforman en osteocitos, donde se mantienen unidos entre si por pequeñas prolongaciones. Los osteoblastos incorporados son reemplazados por otros, a partir de la diferenciación de las células mesenquimáticas, para continuar con la formación de la matriz ósea. Las pequeñas trabéculas recién formadas se ubican formando mallas entretejidas y ramificadas entre los vasos sanguíneos. Estos a medida que hacen contacto con zonas vecinas semejantes, forman el tejido óseo esponjoso, con tejido ricamente vascularizado en los espacios denominado esponjosa primitiva (Fig. 2).

Donde esta destinada la formación de tejido óseo compacto, se produce un engrosamiento de las trabéculas por depósito de tejido óseo recientemente

formado, disminuyendo los espacios ocupados por el tejido conectivo, formando la compacta primitiva (Fig. 3).

El resultado es una formación de tejido óseo primitivo, vascularizado, rodeado de una membrana condensada de mesénquima vascular, que luego se transforma en periostio.

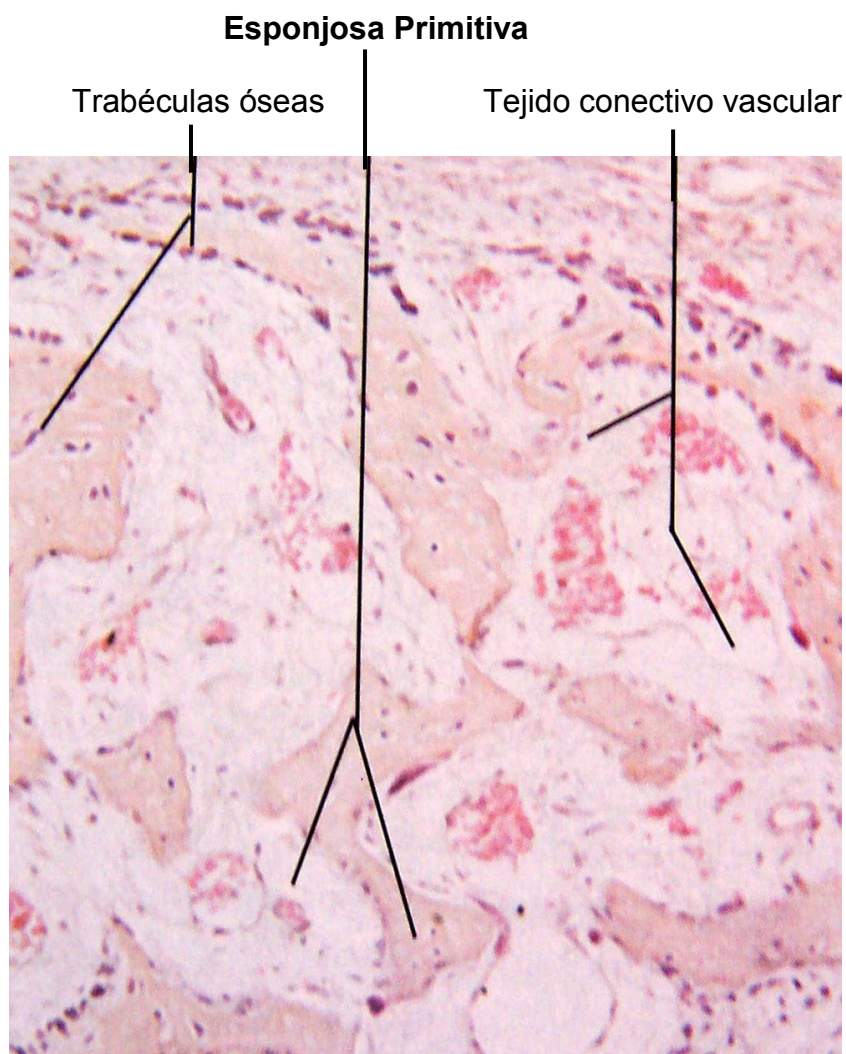


Fig. 2. Microfotografía de la esponjosa primitiva de un hueso plano.

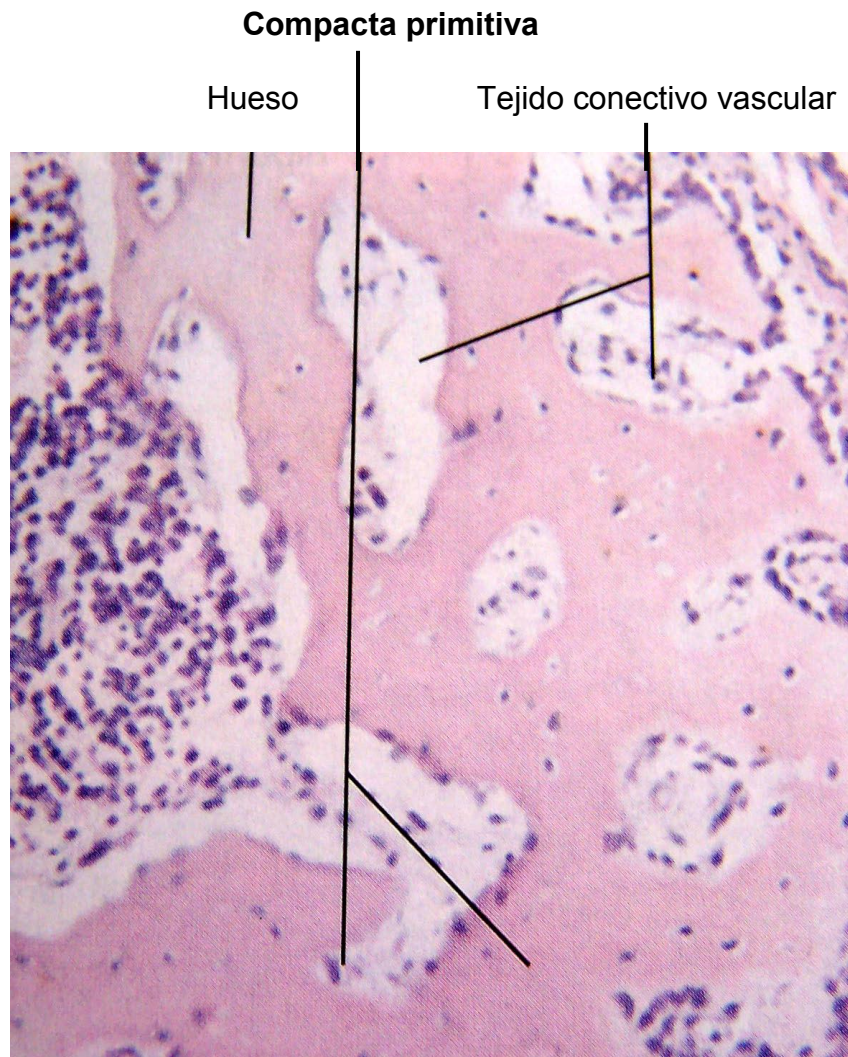


Fig. 3. Microfotografía a de la compacta primitiva de un hueso del cráneo.

1.2. OSIFICACION ENDOCONDRALE

Todos los demás huesos del organismo, es decir, la base del cráneo, columna vertebral, pelvis y extremidades se forman por osificación endocondral y se denominan complejos osteocondrales. Estos previamente están constituidos por cartílago hialino rodeado de pericondrio, que posteriormente, serán reemplazados por tejido óseo.

La osificación endocondral se comprende mejor partiendo desde los huesos largos de las extremidades, donde la osificación del molde cartilaginoso comienza en la 7ma semana. El primer indicio de la formación inicial del hueso se observa en el centro de la futura diáfisis, por la formación del centro de osificación primario, caracterizado por notables modificaciones que sufren los condrocitos (Fig. 4). Estos se hipertrofian aumentando de tamaño las lagunas, reduciendo la matriz cartilaginosa hasta llegar a finos tabiques, los cuales sufren calcificación cuando el plasma sanguíneo y el líquido intersticial del tejido esta presente una suficiente concentración de calcio y fosfato (Fig. 5).

Paralelamente a las modificaciones del cartílago las células del pericondrio en la parte central de la diáfisis adquieren potencial osteogénico, y el pericondrio se transforma en periostio. Las células del periostio sufren transformación a osteoblastos, los cuales depositan una fina capa de tejido óseo alrededor de la parte central de la diáfisis, denominado manguito o collar periostico (Fig. 6). Además tejido conectivo primitivo vascularizado del periostio crece a través del manguito por medio de actividad osteoclástica, lo que se denomina brote periostico y llena los espacios de la matriz cartilaginosa. Los vasos sanguíneos de este brote se ramifican y envían capilares a las cavidades de cada extremo del molde cartilaginoso (Fig. 7).

El brote periostico lleva también células mesenquimáticas al interior del cartílago, muchas de las cuales se diferencian a medula ósea primitiva, y otras, en osteoblastos cuando entran en contacto con el cartílago calcificado. Los osteoblastos utilizan las trabéculas cartilaginosas calcificadas como almacén y comienzan a depositar matriz ósea alrededor de ellas. Las trabéculas óseas

formadas contienen un núcleo de cartílago calcificado, rodeado de una capa de tejido óseo (Fig. 8).

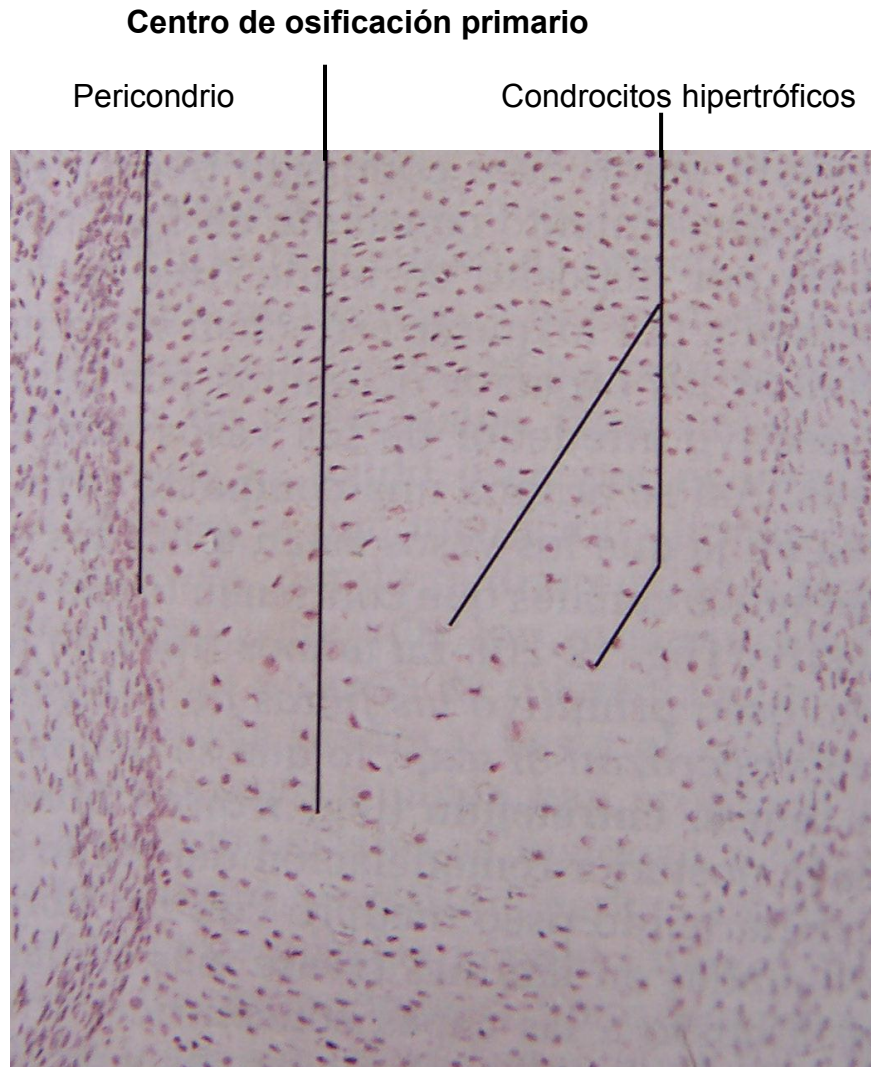


Fig. 4. Microfotografía del centro de osificación primario en la diáfisis.

Centro de osificación primario

Matriz cartilaginosa calcificada

Células cartilaginosas hipertróficas

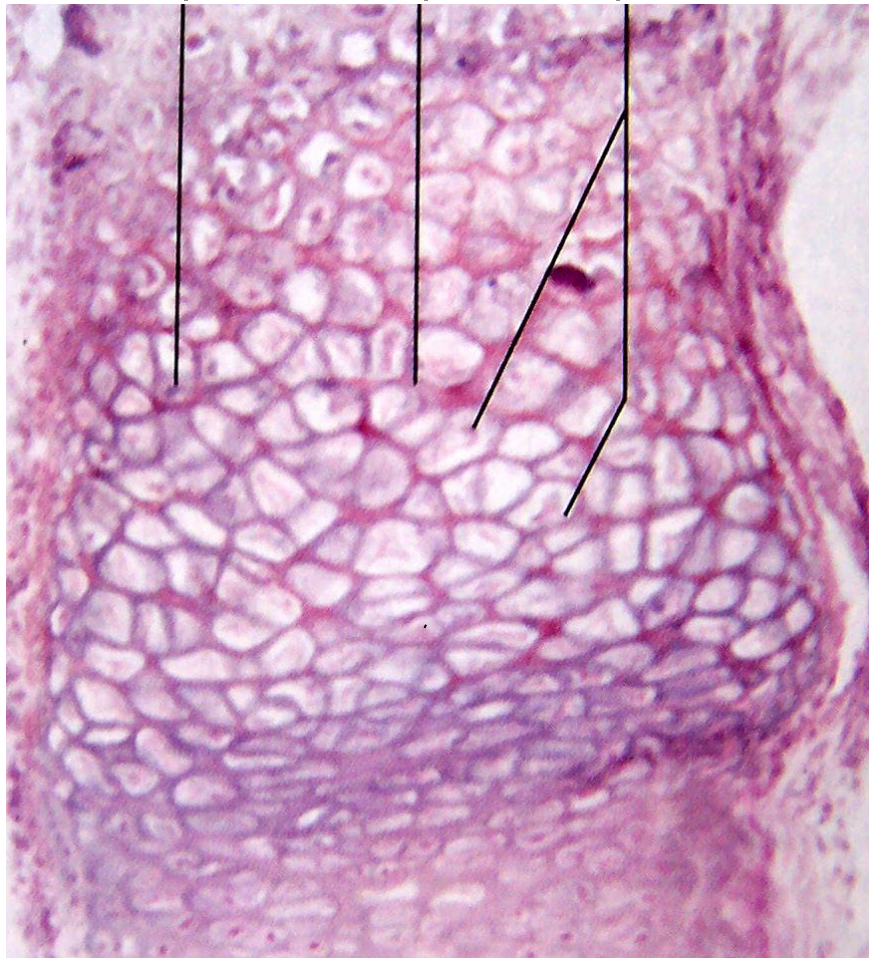


Fig. 5. Microfotografía del centro de osificación primario (diáfisis) en un estadio evolutivo mayor.

Centro de osificación de la diáfisis.

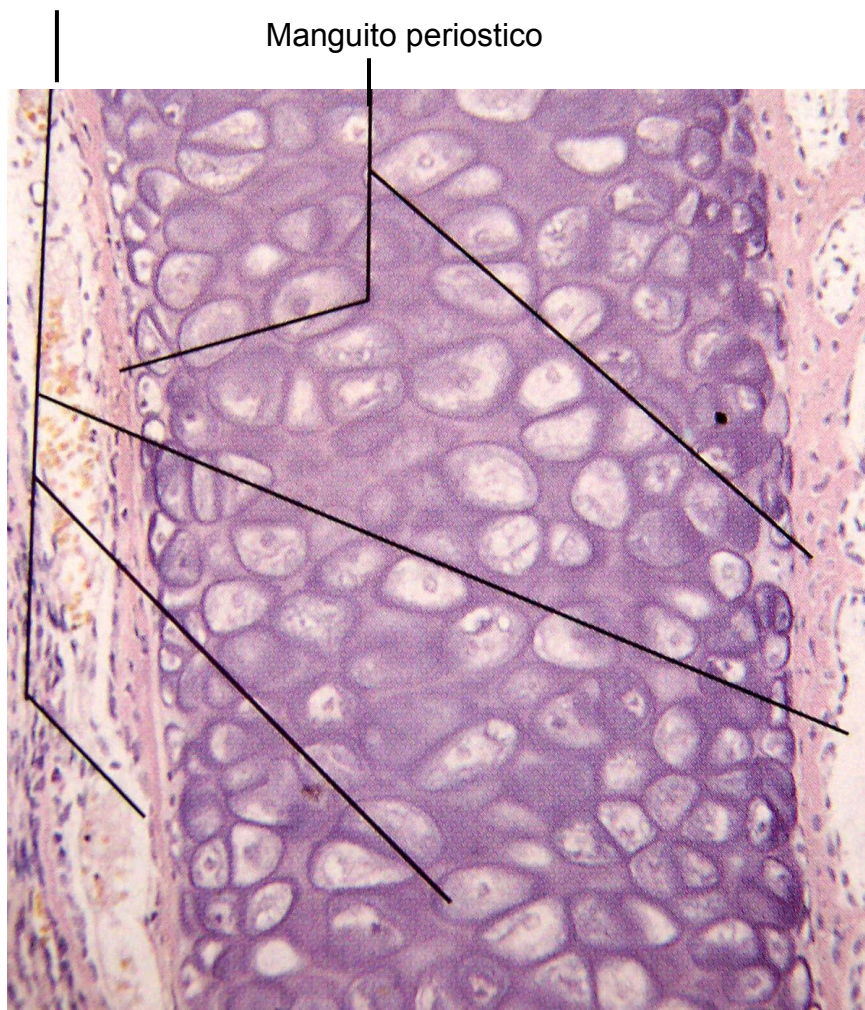


Fig. 6. Microfotografía donde se encuentra el manguito periostico rodeando al cartílago.

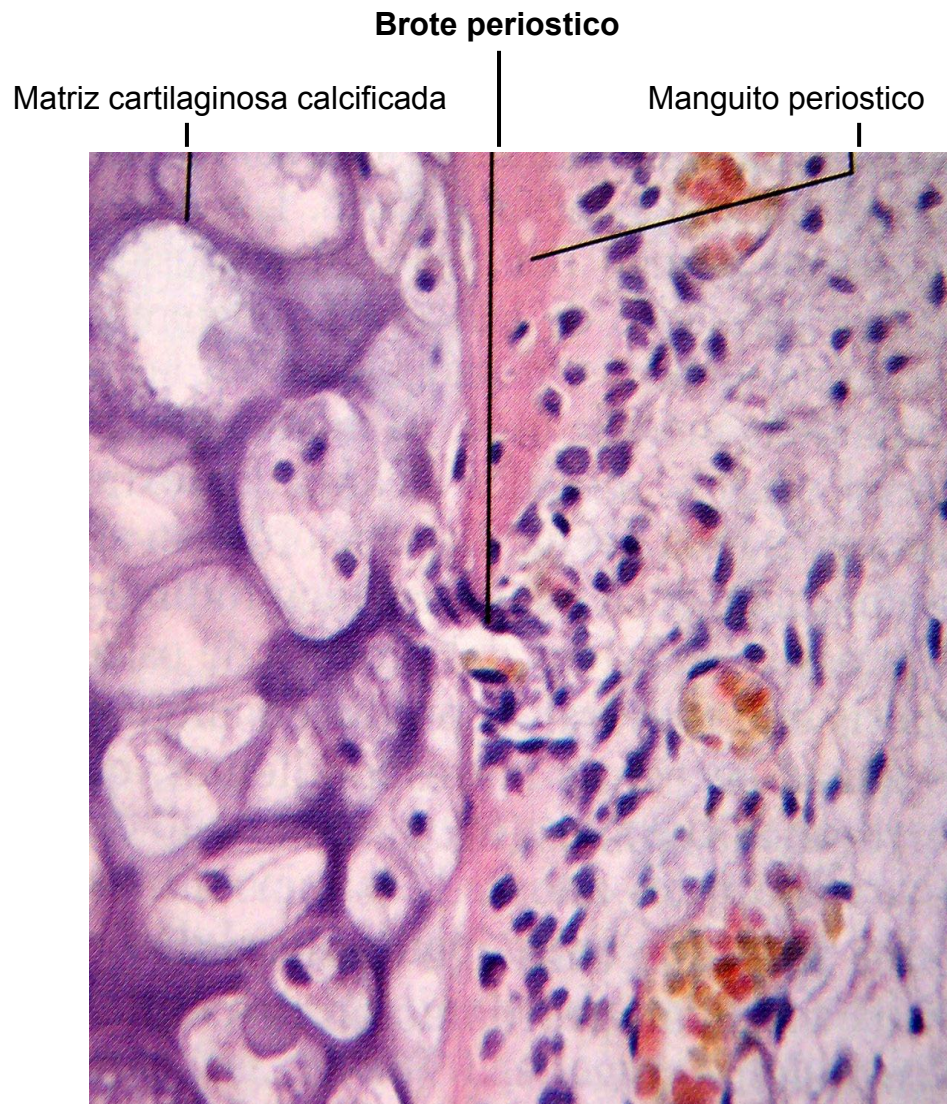


Fig. 7. Microfotografía donde se observa que el brote periostico (con actividad osteoclástica) ha perforado el manguito periostico.

Matriz cartilaginosa calcificada

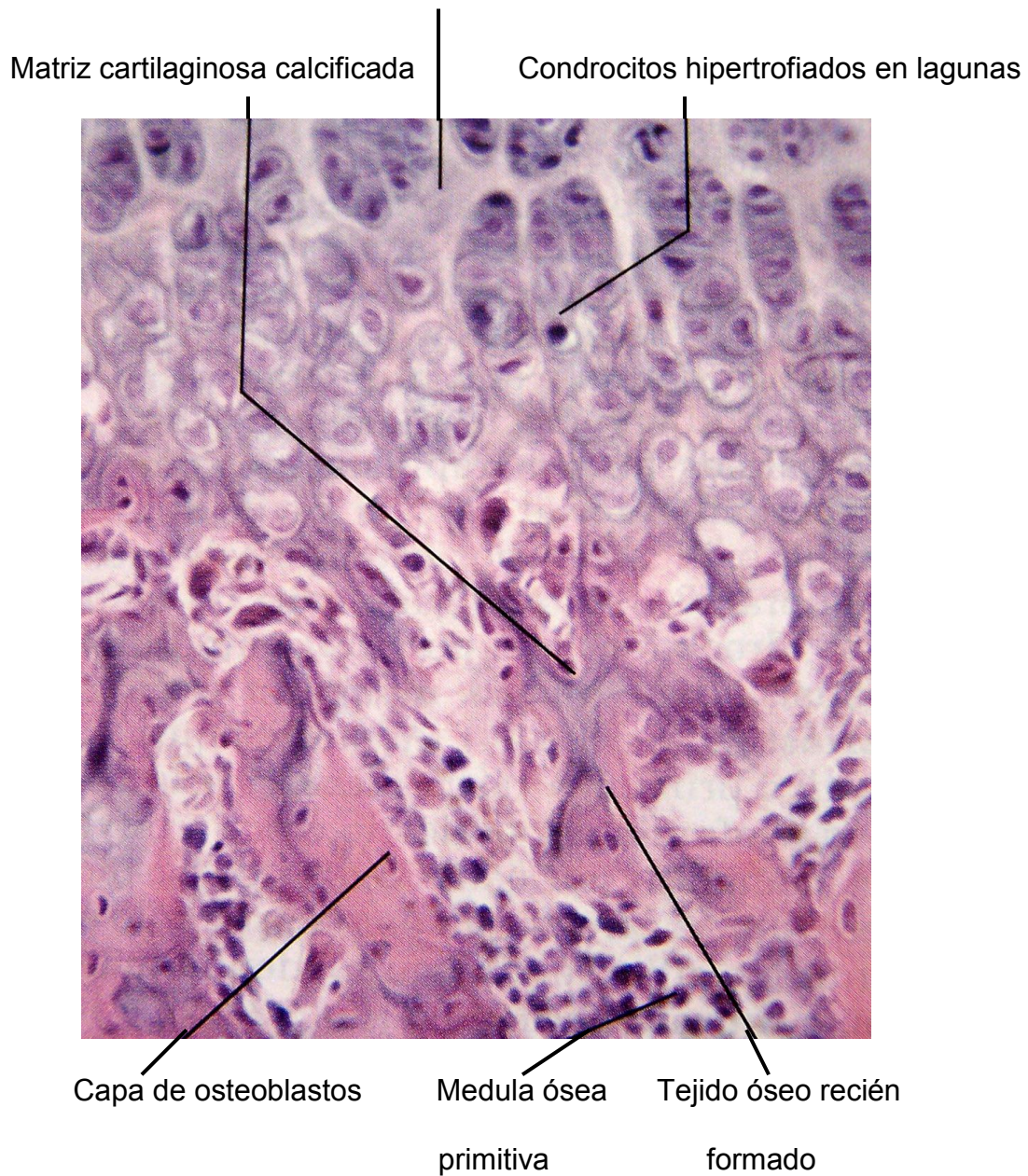


Fig.8. Microfotografía donde se visualizan las trabéculas de matriz cartilaginosa calcificada (teñidas de azul por la hematoxilina) rodeadas por una capa de tejido óseo recién formado.

2. ESTRUCTURA

2.1. ORGANIZACIÓN MACROSCÓPICA

Se organiza de dos formas distintas: hueso compacto (externo) y hueso esponjoso (central).

El tejido óseo compacto forma una masa compacta sin espacios huecos visibles y se ubica en la parte externa.

El hueso esponjoso está compuesto por las trabéculas que se entrecruzan en diferentes direcciones formando un reticulado esponjoso, cuyos espacios huecos están ocupados por la médula ósea.

Además los huesos están rodeados por una capa de tejido conectivo denso, el periostio, y una capa interior fina de tejido conectivo en células, el endostio, el cual recubre el espacio medular.

Tanto el periostio como el endostio poseen potencial osteogénico, es decir, capacidad de formación de hueso (Fig. 9 y 10).

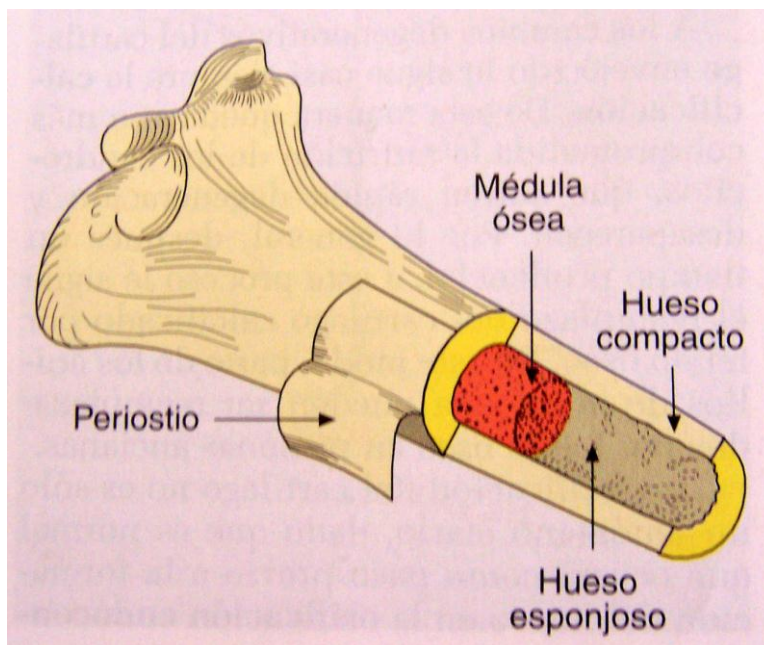


Fig. 9. Esquema sobre la estructura macroscópica del hueso.



Fig. 10. Sección de húmero en el cuello. Disposición de las distintas arquitecturas donde el compacto delimita encierra en su interior al esponjoso.

HUESO COMPACTO

Se organiza en 3 formas diferentes, formando los sistemas de Havers, las láminas intersticiales, y sistemas circunferenciales externo e interno.

En el hueso compacto las láminas óseas están dispuestas en forma concéntrica, rodeando canales longitudinales del hueso, denominados conductos de Havers formando los sistemas de Havers u osteonas (osteón).

Las células óseas u osteocitos se hallan en pequeños espacios alargados, las lagunas, ubicados entre las laminas, con numerosas prolongaciones, que pasan por canales estrechos, los canalículos, los cuales se dirigen en forma radial hacia la cavidad central que corresponde al conducto de Havers, ricos en vasos sanguíneos y nervios. De este modo los osteocitos son capaces de intercambiar sustancias con el torrente sanguíneo. A su vez los

sistemas de Havers se comunican entre si y con las superficies externa e interna del hueso gracias a los conductos de Volkmann. Estos atraviesan al tejido óseo casi transversalmente y por medio de estos los vasos de los conductos de Havers se comunican con los vasos del periostio y el endosito, respectivamente.

La disposición de los Sistemas de Havers varía según los requerimientos mecánicos del hueso.

Los sistemas de laminas intersticiales ocupan los espacios entre los sistemas de Havers y circunferenciales, los cuales son paralelas entre si y de forma irregular.

Por ultimo inmediatamente por debajo del periostio y el endosito se encuentran los sistemas circunferenciales interno y externo, formados por una capa fina de laminas, que corren paralelas entre si, el cual los osteocitos presentes reciben la nutrición del tejido conjuntivo (Fig.11 y 12).

osteocitos en lagunas laminas

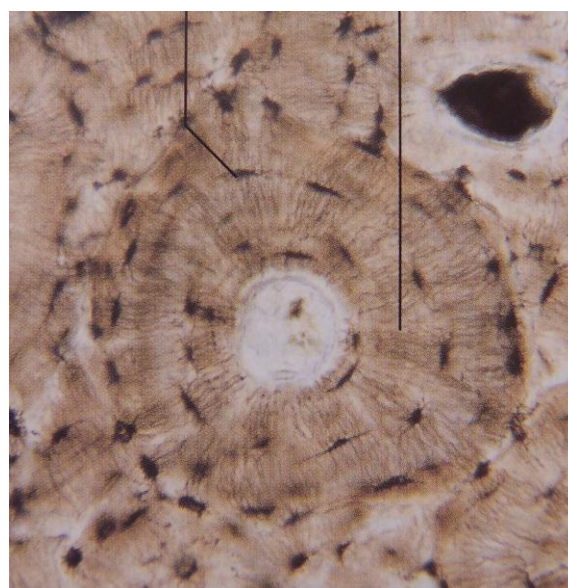


Fig. 11. Sistema de Havers.

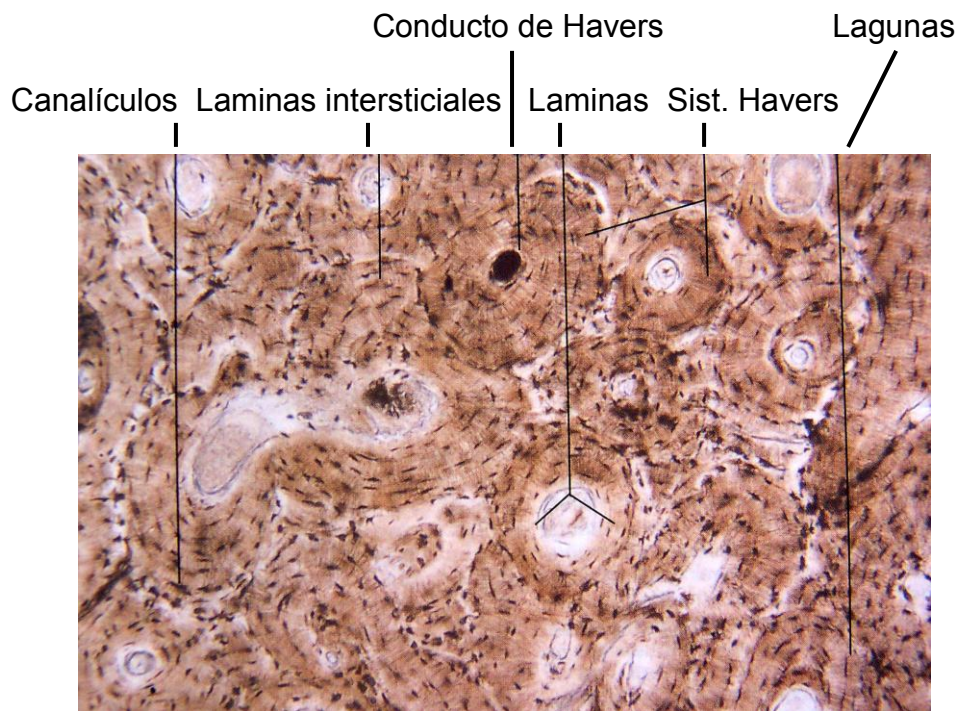


Fig. 12. Microfotografía del tejido óseo compacto.

HUESO ESPONJOSO

También esta compuesto por laminas, pero generalmente no se encuentran formando sistemas de Havers. Solo se observan zonas de láminas paralelas a menudo en dirección longitudinal con una trabéculas. Los osteocitos de las trabéculas óseas se mantienen desde los capilares sanguíneos ubicados en la medula ósea.

La orientación de cada trabéculas y la disposición de sus láminas óseas varían según las tensiones mecánicas locales con el objeto de resistir las compresiones y tensiones a que es sometida.

PERIOSTIO

Esta compuesto, en el periodo de crecimiento del hueso, de una capa interna de tejido conectivo laxo, ricamente vascularizado, en el que se encuentran células formadoras de hueso u osteoblastos, en contacto directo con el hueso.

Una vez finalizado el periodo de crecimiento, los osteoblastos se transforman en células osteoprogenitoras, inactivas, histológicamente idénticas a las células del tejido conectivo. En caso, por ejemplo, de una fractura las células osteoprogenitoras se transforman nuevamente en osteoblastos para formar nuevo hueso y reparar la fractura.

ENDOSTIO

Se compone de una única capa de células aplanadas. Posee también potencial osteogénico.

2.2. MICROSCOPIA

2.2.1. MATRIZ OSEA

Compuesta por una matriz inorgánica (70 %) y orgánica (30 %). La dureza de los huesos de debe a su contenido de sales inorgánica, mientras que su elasticidad depende del colágeno.

MATRIZ INORGANICA

Los componentes inorgánicos del tejido óseo están compuestos por depósitos de fosfato de calcio cristalino. Los cristales son idénticos a los del mineral hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Además del fosfato de calcio, el mineral de los huesos contiene numerosos iones diferentes, entre ellos el magnesio, potasio, sodio, carbonato, citrato, fluoruros, hierro, zinc, etc.

MATRIZ ORGANICA

Formado por fibras de colágeno inmersas en una sustancia fundamental.

Colágeno

Representa el 90 % de la matriz orgánica. Presentan la misma estructura que en el tejido conectivo, es decir, microfibrillas con líneas transversales de un diámetro aproximado de 50 nm.

Sustancia fundamental

El componente rico en glúcidos consta de sialoproteínas y de proteoglucanos, y contiene fundamentalmente condroitinsulfato y pequeñas cantidades de ácido hialurónico.

2.2.2. CELULAS OSEAS

Se encuentran 5 tipos de células óseas: las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los osteocitos, los osteoclastos y las células de revestimiento.

CELULAS OSTEOPROGENITORAS

También llamadas células madres, son relativamente indiferenciadas con carácter de fibroblastos, que persisten tras el nacimiento. Presentan núcleos ovales claros y un citoplasma claro irregular. Las células osteoprogenitoras se encuentran en el mesénquima del feto cerca de los

centros de osificación y en el endosito y la capa profunda del periostio tras el nacimiento.

Durante la formación de los huesos las células osteoprogenitoras sufren división y transformación a células formadoras de hueso u osteoblastos.

OSTEOBLASTOS

Son las células formadoras de hueso, es decir, sintetizan y secretan la matriz ósea. En las zonas de formación ósea forman una capa de células cilíndricas bajas, semejante a un epitelio. Están en contacto entre si por medio de prolongaciones cortas y finas. El núcleo esta localizado en el extremo de la célula mas alejado del hueso recientemente formado y su citoplasma muy basófilo donde contiene un Aparato de Golgi prominente y un RER bien desarrollado.

Estas células no solo sintetizan y secretan la matriz orgánica u osteoide sino que participan en el proceso de mineralización.

Luego de formar hueso sufren dos procesos diferentes: son rodeados por la matriz ósea e involucionan a osteocitos, o permanecen en la superficie ósea recién formada donde se aplanan y se transforman en células de revestimiento (Fig. 13).



Fig. 13. Imagen de un osteoblasto al M.E con un RER bien desarrollado.

OSTEOCITOS

Es la verdadera célula ósea. Estos emiten finas prolongaciones a los canalículos, dentro de los cuales, toman contacto con prolongaciones de osteocitos vecinos o con las células de revestimiento.

Aunque estas células pertenecen a una involución del osteoblasto, donde degradan su RER y Aparato de Golgi, siguen siendo metabólicamente activos capaces de degradar la matriz ósea (osteólisis osteocítica). Esta lleva a la reabsorción del mineral óseo, por lo que los osteocitos desempeñan un papel importante en la calcemia (Fig. 14).

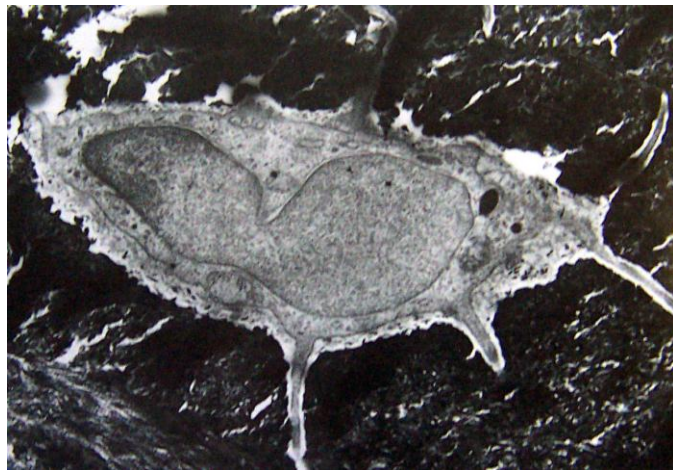


Fig. 14. Osteocito maduro con pocas organelas.

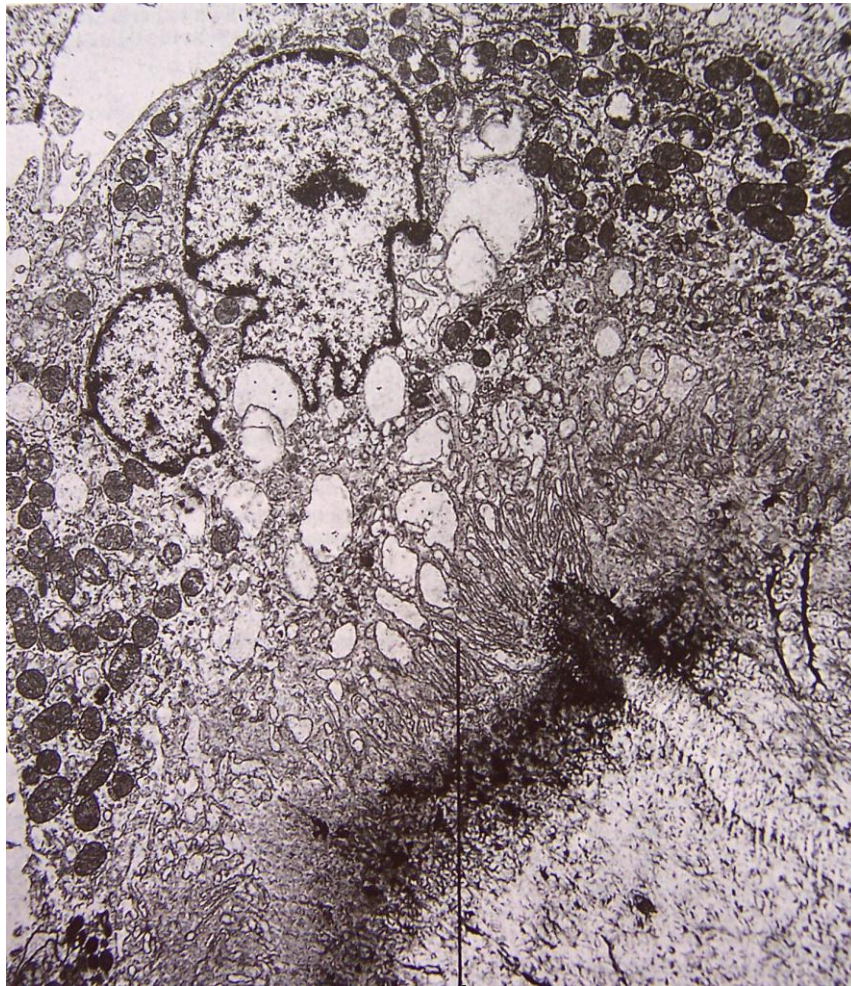
CELULAS DE REVESTIMIENTO

Son células aplanadas que revisten las superficies óseas del interior de los huesos que corresponden en general a osteoblastos inactivos. Estos están asociados entre si y con las prolongaciones de los osteocitos, donde son capaces de iniciar el proceso de remodelado óseo al ser estimulados por factores mecánicos u hormonales locales.

OSTEOCLASTOS

Son las células que degradan el hueso. Son células gigantes multinucleadas de forma y tamaño muy variables.

Se localizan en huecos de la superficie ósea denominados lagunas de Howship. Sobre la superficie ósea que esta siendo removida, se observa un rayado irregular, denominado borde fruncido (Fig. 15). El citoplasma esta fuertemente vacuolado donde gran parte de estos son lisosomas primarios que producen una reacción histoquímica positiva sobre la fosfatasa alcalina.



Borde fruncido

Fig. 15. Imagen de un osteoclasto con numerosas vacuolas y mitocondrias, donde se observa el borde fruncido rodeado de grandes cristales de mineral óseo.

Cuando hay un aumento de la hormona paratifoidea se produce un aumento en la producción y transporte de lisosomas hacia el borde fruncido, mientras que por el contrario, cuando aumenta la calcitonina, se produce la eliminación del borde fruncido y la desaparición de las enzimas lisosómicas.

Los osteoclastos provienen de la fusión de monocitos de la sangre o macrófagos de los tejidos (“proteosteoclastos”) (Fig. 16 y 17).

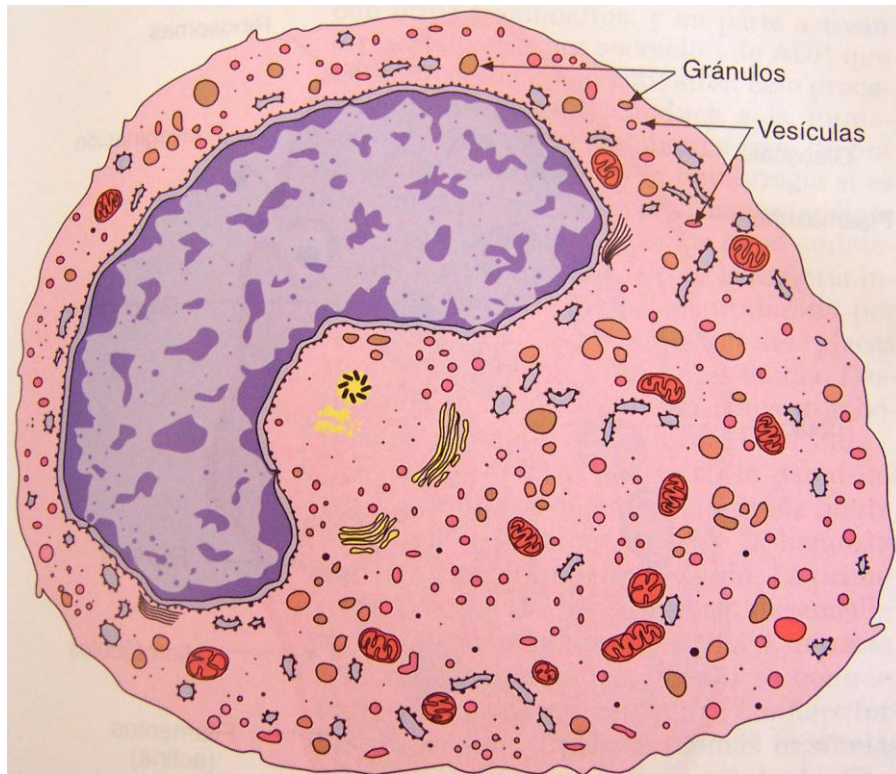
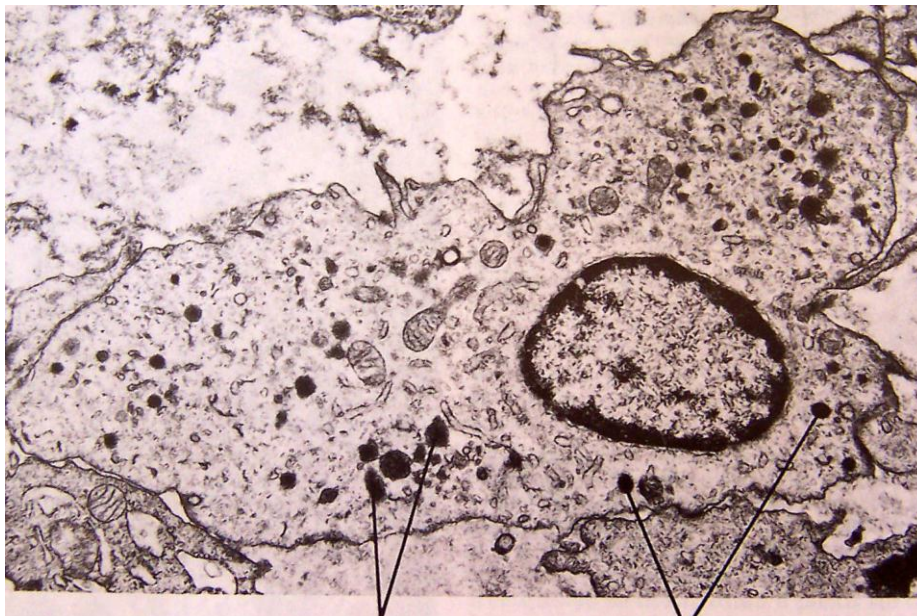


Fig. 16. Esquema de un monocito.



Fagosomas

Lisosomas

Fig. 17. Imagen al M.E. de un macrófago con abundantes lisosomas y fagosomas.

3. AGENTES MITOGENOS O FACTORES DE CRECIMIENTO

Son numerosas biomoléculas que regulan las células óseas para la diferenciación y la proliferación celular :

- a) *Proteína morfogénica del hueso (BMP)*. Ha demostrado poseer actividad mitógena (osteoinductora) estimulando la división celular *in vitro*.
- b) *Factor de crecimiento esquelético (SGF)*. Aumenta la tasa de formación ósea, actuando tanto sobre el número de células como sobre su actividad, favoreciendo la incorporación de prolina en el colágeno y aumentando la acumulación del contenido de fosfatasa alcalina.
- c) *Factor de crecimiento transformador B (B-TGF)*. Son producidos únicamente por los osteoblastos donde después es almacenado en la matriz ósea para ser activo durante la resorción ósea estimulándola.
- d) *Factor de crecimiento similar a la insulina (ILGF)*. La producción de este factor está estimulada por una variedad de agentes sistémicos que incluyen la hormona del crecimiento, la somatostatina, la insulina y la vitamina 1,25 (OH)₂D₃. Además de ser un mitógeno celular estimula la síntesis de colágeno por parte de los osteoblastos.
- e) *Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)*. Involucrado en el proceso de reparación de los tejidos (osteogénesis) ,y constituye una señal quimiotáctica para los fibroblastos (angiogénesis) y para otros tipos de células involucradas en la cicatrización de las heridas. Por lo tanto, es posible que el PDGF pueda realizar una estimulación de la actividad quimiotáctica sobre los precursores de las células óseas.

- f) *Factor de crecimiento catiónico derivado del cartilago (CDGF)*. Favorece la formación de tejido de granulación y de colágeno, desempeñando un papel importante en la angiogénesis .

4. MODELACION Y REMODELACION OSEA

Durante todo el crecimiento en los huesos de una persona hay un proceso de constante neoformación y reabsorción ósea, hecho que determina el aumento de la cantidad y el crecimiento del hueso. En los adultos existe un equilibrio entre la neoformación y reabsorción, de manera tal que la masa ósea no varia; en la vejez. La neoformación es menor que la reabsorción y la masa ósea disminuye lentamente.

Estos procesos de neoformación y reabsorción se desarrollan simultáneamente en todo el hueso. Así, por acción de los osteoclastos se forman continuamente áreas de reabsorción ósea, que a su vez son llenadas con nuevo hueso depositado por los osteoblastos. Estas dos actividades son independientemente entre si, con predominio de la segunda durante el todo el crecimiento, es decir, la infancia y la primera juventud. Estos procesos no están acoplados entre si, a diferencia de la actividad acoplada de la remodelación ósea. Cuando existe el predominio de formación de hueso hay un incremento constante de la masa ósea hasta alcanzar un valor máximo de “masa ósea pico”, a los 20-25 años, adquiriendo el esqueleto su tamaño y forma definitivos.

En los primeros estadios de la vida posnatal comienza otro proceso en el tejido óseo llamado remodelación, donde se reemplaza el tejido óseo formado por tejido nuevo. La remodelación comienza en la primera infancia y continúa durante toda la vida, actuando paralelamente a la modelación durante el

crecimiento. Aquí la actividad de los osteoblastos y osteoclastos esta acoplada, de manera que trabajan en conjunto como una unidad, denominada “unidad remodeladora ósea” (BRU), donde se forma la misma cantidad de hueso que se reabsorbe, regulado por un sistema llamado Mecanostato óseo.

Durante el modelado se forma el tejido óseo compacto primitivo, donde las fibras de colágeno de los sistemas de Havers primitivos u osteonas primarias transcurren en todas las direcciones para generar láminas no muy bien definidas. Por remodelación estos sistemas se transforman en sistemas de Havers definitivos u osteonas secundarias que contienen láminas concéntricas formadas por fibras colágenas de transcurso paralelo. La remodelación comienza cuando un grupo de preosteoclastos se activan a osteoclastos para comenzar a reabsorber el hueso formando conductos cilíndricos. Después de reabsorber se produce el crecimiento interno de vasos recién formados dando a lugar la diferenciación de osteoblastos que depositan capas de tejido óseo laminar sobre las paredes del conducto, donde estos quedan rellenados y da a lugar a la formación de una osteona cortical secundaria. Una vez terminada la formación ósea los osteoblastos se transforman en células de revestimiento tapizando el conducto de Havers (Fig. 18).

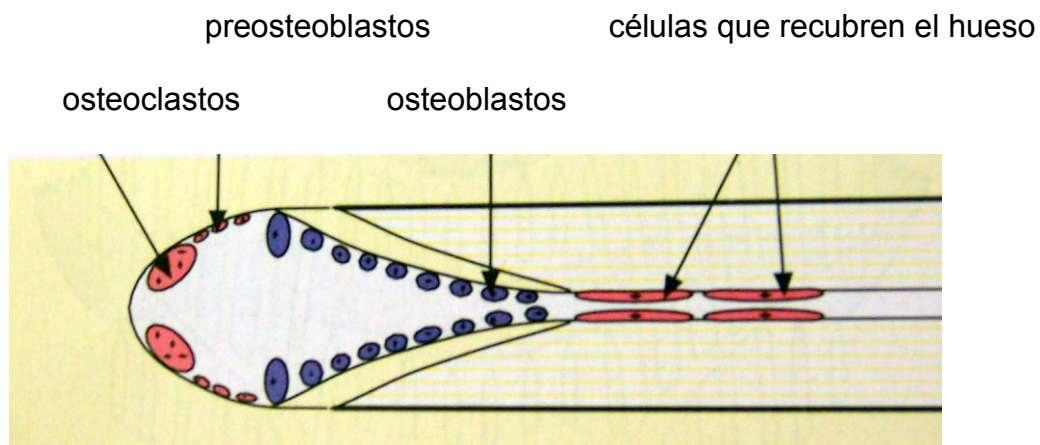


Fig. 18. Unidad remodeladora de hueso compacto.

En el tejido óseo esponjoso primitivo a diferencia del anterior, los osteoblastos no reabsorben un conducto sino un surco, donde este comienza en la superficie de una trabéculas y desciende hasta una profundidad de unos 70 μm . Aquí también los osteoblastos terminan transformándose en células de revestimiento donde forman una capa delgada sobre la superficie de la trabécula. El tejido óseo laminar recién formado que ocupa el surco de reabsorción representa una osteona trabecular nueva (Fig. 19).

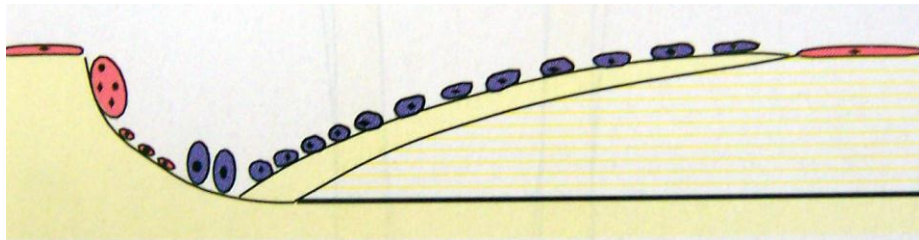


Fig. 19. Unidad remodeladora de hueso esponjoso.

La remodelación constituye un recambio gradual de todo el tejido óseo primitivo por hueso laminar maduro, pero además es un proceso que continúa durante toda la vida.

La frecuencia con que cada zona ósea sufre remodelación se denomina “frecuencia de activación” y se define por la frecuencia con la cual se forma una unidad remodeladora ósea por la activación de un grupo de osteoclastos en un mismo sitio. En un adulto se remodela el hueso trabecular con una frecuencia de 10 veces mayor que el hueso cortical. La frecuencia de activación es afectada por factores locales como citoquinas secretadas, factores de crecimiento, y por sobrecargas mecánicas que sufra el tejido óseo, pero también por hormonas como la paratiroidea y sexuales.

El objetivo del proceso de remodelación es reemplazar el tejido óseo envejecido que por sobrecargas puede presentar microfracturas u osteonas muertas. Este es reemplazado por tejido nuevo de mayor calidad. También asegura el mantenimiento de la homeostasis del calcio.

Posteriormente a alcanzar la “masa ósea pico”, a partir de los 30-40 años, la remodelación es la responsable de una pérdida gradual e irreversible de masa ósea durante el resto de la vida. Esto ocurre porque cada unidad remodeladora ósea reabsorbe más hueso del que se forma.

4. MECANOSTATO OSEO

Sistema presoreceptor formado por los osteocitos y sus prolongaciones citoplasmáticas las cuales informarían sobre las deformaciones óseas producidas ante presiones, tracciones y fuerzas de desplazamiento que soporta cada parte del hueso y, de esta manera, conseguir un hueso que responda a los requerimientos biomecánicos a los que está siendo sometido, por medio de remodelación.

La variable regulada por el mecanostato es la rigidez-deformación ósea. El punto de referencia (set point) considerado normal para la deformación ósea es 0,2 % de la longitud del hueso. Cuando un hueso es sometido a fuerzas que producen esta deformación, retirada la fuerza, el hueso retorna a su forma habitual (deformación elástica). Sometido a deformaciones mayores (deformación plástica), no recupera su forma habitual, dado que se producen microfracturas.

5. UNIDAD REMODELADORA OSEA (BRU)

Es la herramienta utilizada por el mecanostato para regular la rigidez ósea o indeformabilidad. Esta compuesta por un acoplamiento secuencial de osteoclastos encargados de destruir hueso y osteoblastos encargados de reponerlo y mineralizarlo pasando a ser osteocitos de acuerdo con las nuevas necesidades biomecánicas, indicadas por el mecanostato. En el ser humano, 3 a 4 millones de BRU operan por año y un millón de ellas se encuentran trabajando en cada momento de la vida.

La puesta en marcha de esta unidad funcional remodeladora se ubica en los lugares donde el hueso necesita ser reemplazado. La información esta dada por el mecanostato o por estimulación de la hormona paratiroidea (PTH). El tejido óseo neoformado no será reemplazado por un periodo comprendido entre dos a cinco años.

Fisiología de la BRU. La duración de la actividad de cada BRU es de 6 a 9 meses, este tiempo es fundamental para que el trabajo de remoción y formación se complete adecuadamente. Para esto se requiere un abastecimiento permanente de células, dado que la vida de los osteoclastos es de dos semanas, mientras que la de los osteoblastos es de tres meses.

Cualquier desperfecto en la provisión celular o en el nacimiento celular lleva a un desequilibrio en la homeostasis de la BRU, y por lo tanto a un deterioro en la parte ósea donde se encuentre actuando. Estos desequilibrios conllevan alteraciones en la calidad ósea de ese sitio y del hueso en general.

La principal causa es la muerte prematura o sobrevida de alguno de los tipos celulares, produciendo un desbalance en esta actividad celular acoplada.

Nacimiento y vitalidad de los osteoblastos. El nacimiento de los osteoblastos depende de la diferenciación de la célula progenitora en célula precursora del osteoblasto. Esto es activado por la BMP (proteína morfogenética ósea) la cual actúa sobre el ADN iniciando la cascada de diferenciación celular, posteriormente actúan otros factores como el factor de crecimiento fibroblástico (TGF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF), transformando al osteoblasto en una célula madura.

Nacimiento y vitalidad de los osteoclastos. Depende de un grupo de citoquinas (interleuquina IL1 e IL6) y de factores formadores de colonias como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor macrófago estimulador (ME). Ambos componentes, junto a la acción de prostaglandinas, estimulan la formación celular. Otros factores estimuladores son la hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D.

Los osteoclastos se originan en la médula ósea hematopoyética por la fusión de los progenitores (monocitos). Luego de su maduración llegan a alcanzar un gran tamaño.

Muerte de las células óseas. Puede darse por dos mecanismos: apoptosis o por acción de factores hormonales. La apoptosis es el proceso de muerte natural programada, indicada en el ADN, que es de dos semanas para los osteoclastos y de tres meses para los osteoblastos. Cuando estos últimos se convierten en osteocitos su vida se prolonga mucho más tiempo aunque finalmente termina en una apoptosis.

El factor más común de muerte celular es la inmovilidad, en los sitios donde los osteocitos dejan de ser estimulados por cargas, aumentando la apoptosis celular seguida por una disminución de la población total de células.

Por eso el desuso óseo es una causa importante de pérdida de hueso.

Los cambios hormonales, en la menopausia o senilidad, disminuyen la población de osteocitos. Algunos factores liberados en la inflamación (citoquinas) aceleran la apoptosis celular y a su vez producen activación anormal de osteoclastos.

El tratamiento con corticoides tiende a acelerar la apoptosis de osteocitos y osteoblastos.

6. METABOLISMO OSEO

Como habíamos mencionado, el tejido óseo da al esqueleto dureza y fortaleza para capacitarlo para sus funciones mecánicas. Por esto los huesos contienen el 99 % del calcio del organismo representando un importante depósito de este.

Parte de este depósito funciona como amortiguador (“buffer”) del contenido sanguíneo de calcio, ya que el 0.5-1 % del calcio de los huesos constituye el denominado calcio intercambiable, pudiendo rápidamente tomar o ceder iones de calcio al plasma sanguíneo. Este calcio intercambiable se encuentra principalmente absorbido a la superficie de los cristales de apatita como CaHPO_4 (Fig. 20).

El mecanismo de regulación del calcio sérico es de naturaleza hormonal y es mediado por la hormona parathormona (PTH) y la calcitonina, y por la forma activa de la vitamina D (1.25 dihidroxicolecalciferol).

La PTH es secretada por las glándulas Paratifoideas y es reguladora de la calcemia. Es decir aumenta su secreción cuando disminuye la calcemia, aumentando la reabsorción ósea, de modo que pasan al plasma calcio del hueso no intercambiable, la reabsorción tubular renal de calcio y la absorción intestinal de calcio; por lo tanto aumenta la calcemia.

La calcitonina es secretada por las células C de la glándula tiroides. Esta produce hipocalcemia inhibiendo la reabsorción ósea y disminuyendo la reabsorción tubular renal de calcio.

La vitamina D se sintetiza por la acción de la luz solar y su principal metabolito es 1.25-(OH) 2-vitamina D cuando esta es hidroxilada en el hígado y riñón, por estímulo de la PTH. Produce un aumento en la absorción intestinal de calcio y estimula la calcificación del tejido óseo. En dosis mayores aumenta la reabsorción ósea.

Otras hormonas actúan sobre el metabolismo óseo como la somatotrofina, los estrógenos y los corticoesteroides.

La somatotrofina (STH) produce hipercalcemia debido a la disminución de la reabsorción tubular de calcio en presencia de la PTH.

Los estrógenos tienen gran importancia en el mantenimiento del hueso en las mujeres adultas. Su disminución es causal de osteoporosis posmenopáusica, cuando tienen acción directa sobre los osteoblastos.

La administración prolongada de corticoesteroides lleva a la osteopenia a través de dos mecanismos: 1) inhibición directa de la formación ósea al actuar directamente sobre los osteoblastos; 2) estimulación indirecta de la reabsorción ósea mediada por una inhibición de la absorción intestinal de calcio.

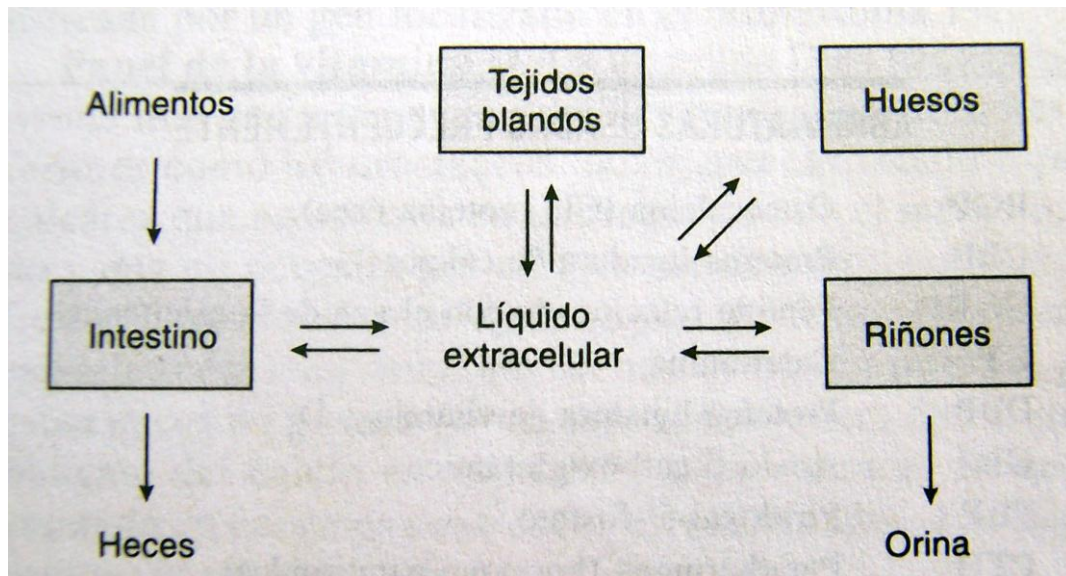


Fig. 20. Movimiento del calcio y del fósforo en el organismo.

II. REGENERACION OSEA GUIADA (OSTEOPROMOCION)

Es el proceso que permite que un defecto estructural en el hueso pueda ser corregido mediante la formación de un tejido de iguales características al original.

Se basa en el principio de la protección de un espacio, mediante la utilización de medios físicos, para la rápida proliferación de tejidos no osteogénicos. Para que se produzca este proceso de neoformación deben estar presentes dos condiciones específicas:

- a) *Hueso vital adyacente al defecto*, con capacidad de suministrar células osteogénicas y un adecuado soporte vascular a través de la invasión de vasos sanguíneos;
- b) *Estabilidad mecánica del hematoma*, mediante injertos con comportamiento osteoconductor y membranas (reabsorbibles o no reabsorbibles) con capacidad de crear y mantener un espacio capaz de:

. Evitar la deformación del coagulo, en vías de organización, después de la presión de los tejidos adyacentes;

. Prevenir la invasión masiva de fibroblastos, que tienden a ocupar con rapidez el espacio con tejido fibroso de cicatrización, que no tienen la capacidad de formar nuevo hueso.

1. PROCESO BIOLÓGICO DE REGENERACION OSEA GUIADA

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

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

2. INJERTOS OSEOS

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

Según su composición dicho material puede clasificarse como:

- Osteogénico, produciendo nuevo hueso estimulando la diferenciación de los elementos mesenquimáticos en células con capacidad osteoformativa (osteoblastos vitales).
- Osteoinductor, capacidad intrínseca de inducir la formación de nuevo hueso a partir de los precursores mesenquimatosos (proteínas morfogenéticas óseas). La cinemática de los sucesos osteoinductivos conlleva a la acción quimiotáctica, la proliferación y la diferenciación de los elementos celulares provenientes de la zona huésped y en parte sobrevivientes del estroma medular del hueso injertado.
- Osteoconductor, capacidad extrínseca de un injerto de servir de matriz o andamiaje estable a través del cual puede cumplirse la deposición de nuevo hueso. La actividad osteogénica se realiza por neoformación, del lecho receptor sobre las estructuras arquitecturales de los márgenes del injerto, para después extenderse hacia el interior y sobre las superficies del hueso injertado. Este modelo de progresión, llamado también creeping o trepado, se da en forma centrípeta y requiere un adecuado soporte vascular y elementos mesenquimatosos listos para diferenciarse en osteoblastos nuevos. La cinemática de estos eventos osteoconductores conlleva al cumplimiento de procesos de neoangiogénesis que anticipan el proceso integrador y determinan el esquema característico de progresión originados en la zona huésped.

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

Analizaremos a continuación primero al hueso autólogo, y luego los sustitutos óseos, en particular al Sulfato de calcio.

2.1. HUESO AUTOLOGO

Es el material de injerto ideal, constituido por hueso tomado del mismo paciente. El mayor inconveniente consiste en la cirugía adicional para tomar el hueso a injertar, usualmente en la zona del mentón, trígono retromolar, tuberosidad del maxilar, y en menor medida de calota craneana o cresta iliaca, dependiendo de la cantidad necesaria (Fig. 21 a 27). Sin embargo, en ocasiones es factible tomar hueso de las zonas adyacentes al defecto a tratar con lo cual este problema se elimina. En estos casos se utilizan cinceles para recolectar pequeños fragmentos o bien se puede desgastar el hueso con un motor y luego aspirarlo con una cánula especial con un filtro en su interior, que recoge las partículas. Esta forma es muy útil, ya que puede utilizarse durante las osteotomías para la colocación de implantes, y presenta una consistencia muy buena, similar a una pasta, que facilita su colocación en el defecto a tratar. Por ultimo, cabe destacar que el injerto autólogo es el único que cumple con las tres vías para la formación de hueso nuevo (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción).

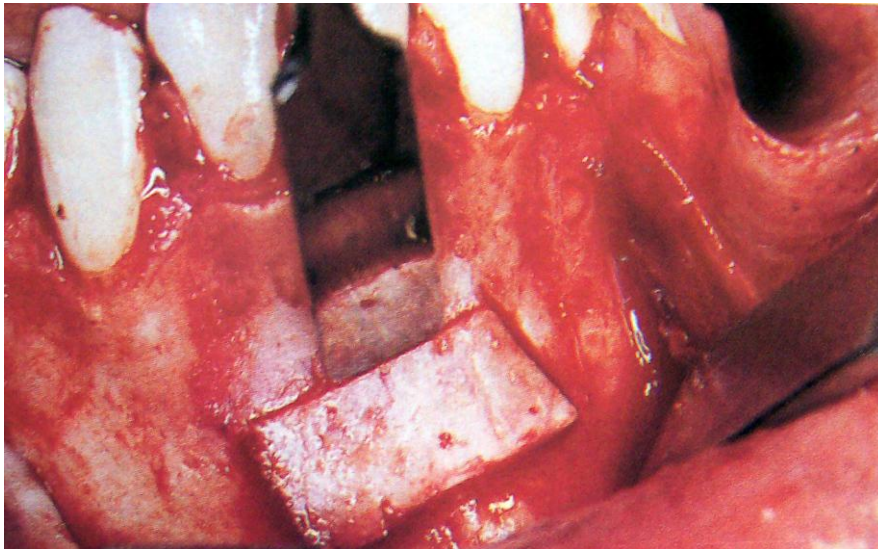


Fig. 21. Extracción del injerto de la sínfisis. Se levanta cuidadosamente para determinar la fractura de la porción endostal.

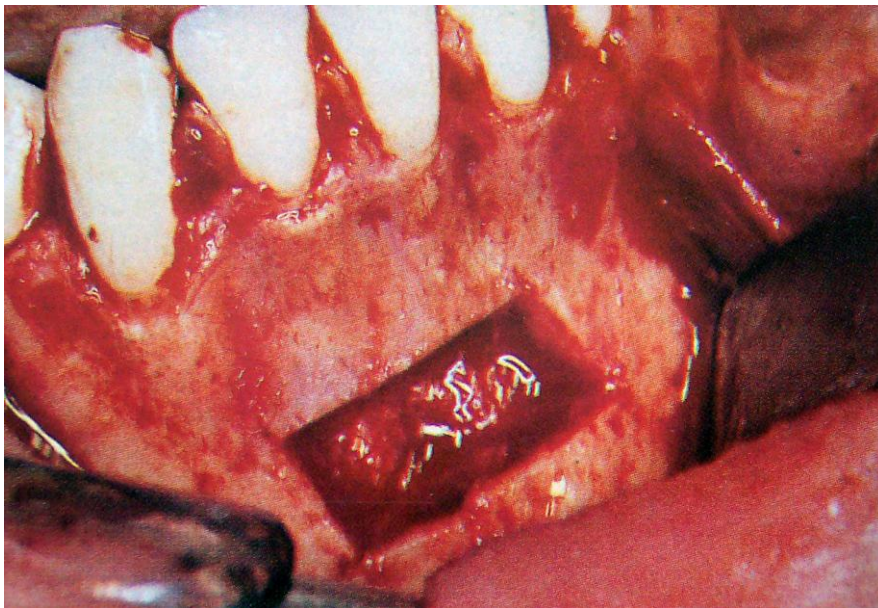


Fig. 22. Separación del injerto.

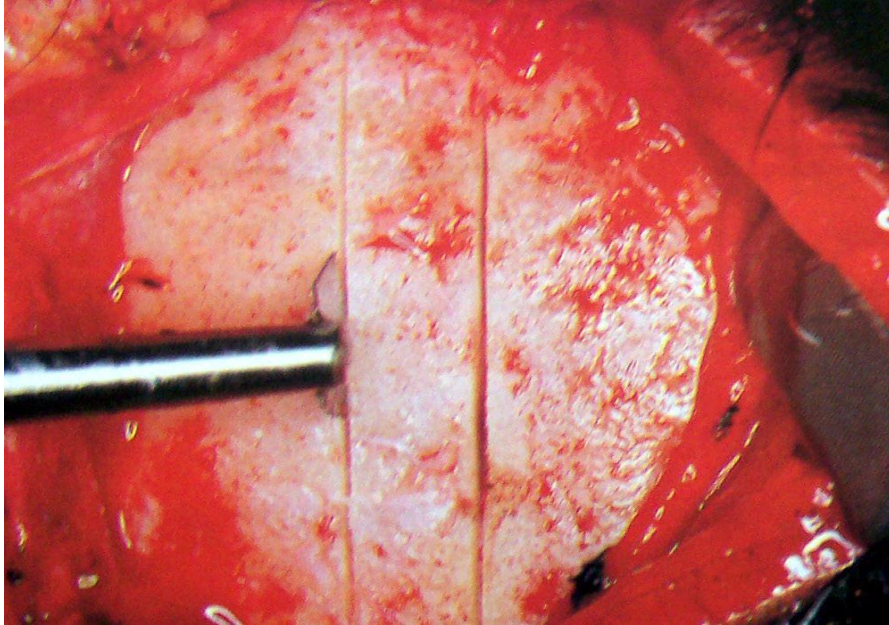


Fig. 23. Toma de injerto cortico-esponjosa en bloque. Mediante Instrumental rotatorio se crean dos valles.

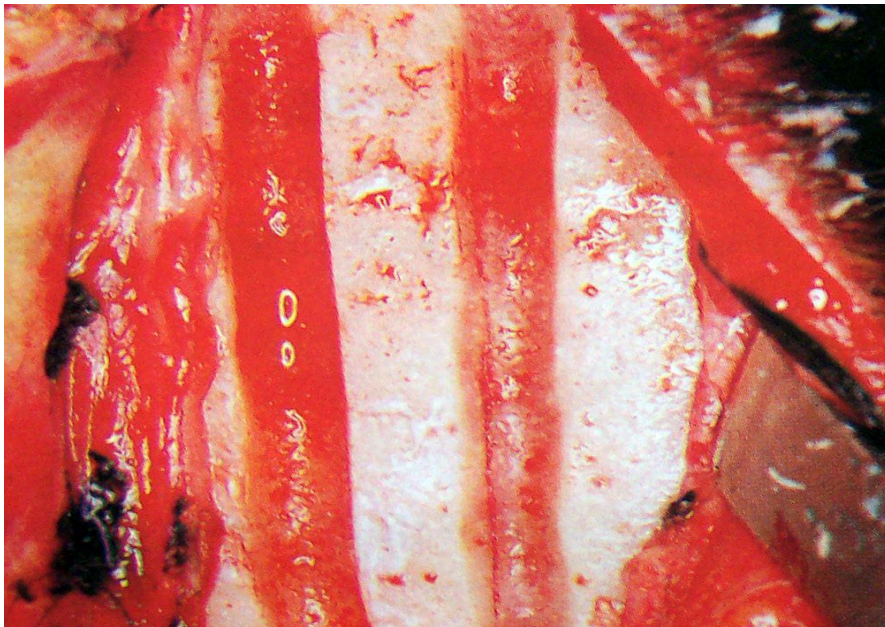


Fig. 24. Valles creados.

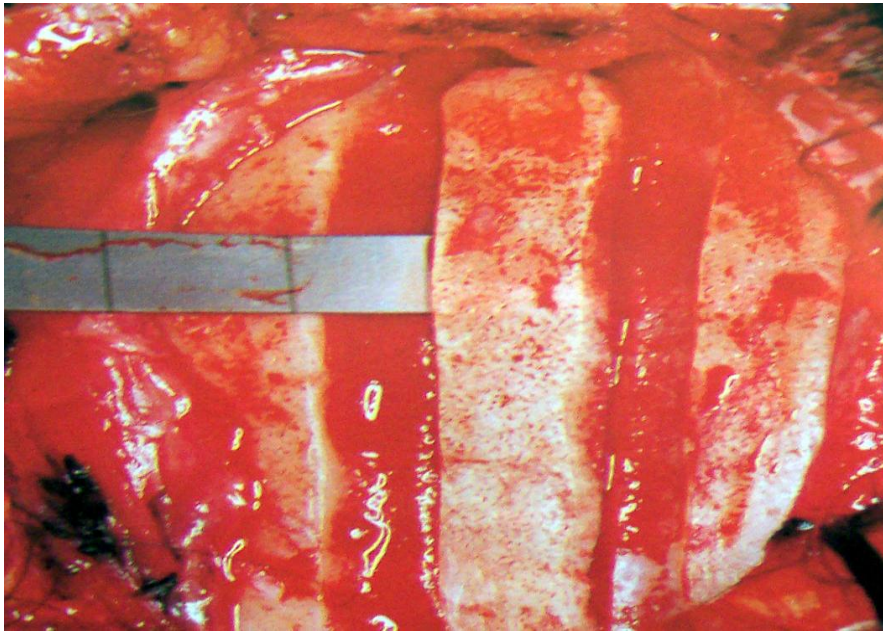


Fig. 25. Separación del injerto con escoplos delgados.

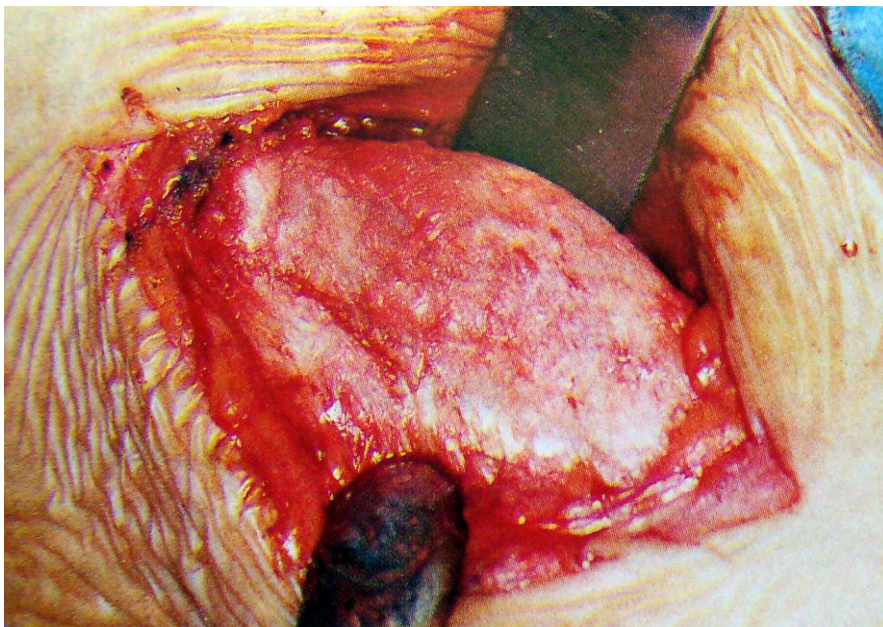


Fig. 26 Toma de muestra de la cresta iliaca.



Fig. 27. Obtención del bloque mediante osteotomía.

2.2. HUESO HOMOLOGO

También llamados aloinjertos, son tomados de otros individuos de la misma especie pero de diferentes genotipos. Se obtienen de cadáveres, se almacenan y procesan en bancos. Tiene ventajas debido a que se elimina el sitio donante en el paciente, se disminuye el tiempo quirúrgico y de anestesia y se presenta menor pérdida sanguínea durante la cirugía; es de vital importancia revisar adecuadamente las historias clínicas de los pacientes con el fin de evitar los que tengan antecedentes de infecciones, neoplasias malignas, enfermedades óseas degenerativas, hepatitis B o C, enfermedades de transmisión sexual, SIDA y otras enfermedades que afectan la calidad del hueso y podrían afectar la salud del receptor. Los aloinjertos pueden formar hueso a través del efecto de la osteoinducción y la osteoconducción; mientras que no se da en el proceso de la osteogénesis debido a que el injerto no

posee células vivas, por lo tanto la formación ósea es lenta y se pierde volumen apreciable si se compara con el injerto autólogo.

El aloinjerto se comporta como una estructura que permitirá el crecimiento de nuevo hueso a partir del reemplazo gradual que sufre el injerto por el hueso huésped.

2.3. HUESO HETEROLOGO

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

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

2.4. MATERIALES SINTETICOS DE ORIGEN QUIMICO

También llamados aloplásticos. Entre los mas utilizados tenemos la Hidroxiapatita parcialmente reabsorbible y el Sulfato de Calcio.

Hidroxiapatita

Se utilizan como alternativa a los injertos de hueso autólogo con resultados satisfactorios para el relleno de defectos óseos residuales y el sostén de los tejidos blandos. La optima biocompatibilidad del material hace

que el tejido mineralizado pueda crecer, envolviendo los gránulos del material que por si solos no presentan capacidad inductiva osteogénica, pero promueven la neoformación ósea, suministrando solo un andamiaje o matriz para la migración de células osteogénicas (Fig. 28 y 29).

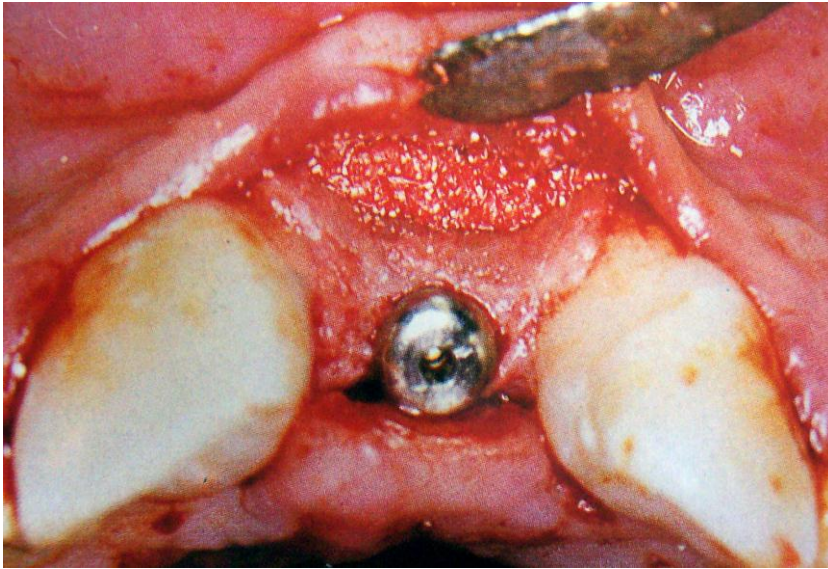


Fig. 28. Colocación de un implante quedando un defecto óseo importante que traerá a futuro problemas estéticos.



Fig. 29. Colocación del injerto creando una barrera.

Sulfato de calcio

Este tiene una larga historia de uso en medicina y odontología, debido a su gran disponibilidad, biocompatibilidad y bajo costo. Por su lenta reabsorción tiene buena capacidad osteoconductora.

Muchas veces en la clínica odontológica, ante una extracción dentaria defectuosa, se produce una gran pérdida de hueso. Si a esto le agregamos que la cicatrización de la herida se caracteriza por remodelación y reabsorción ósea, se produce una gran reducción de volumen óseo. El sulfato de calcio fue así que comenzó a ser investigado y utilizado en los alvéolos post-extracción como relleno y barrera para evitar la proliferación del tejido conectivo, y así aumentar el volumen óseo en altura y anchura, requisito fundamental para la inserción de implantes en el lugar adecuado, según el principio de axialidad de la oclusión orgánica fundada por la escuela gnatólogica. Después de tres meses se realizaron observaciones histológicas donde el material fue completamente reabsorbido permitiendo la nueva formación de hueso trabecular.

Cuando hablamos de cicatrización ósea, no podemos dejar de lado los vasos sanguíneos, ya que son un comportamiento importante en la formación y mantenimiento de hueso. El proceso de inducción vascular se llama angiogénesis, y desempeñar un papel fundamental en todos los procesos regeneradores. La diferenciación de tejido óseo se relaciona con la presencia local de vasos sanguíneos. Estudios de conejos tratados con sulfato de calcio y con hueso autólogo fueron realizados con el propósito de obtener una evaluación comparativa de la densidad de los capilares que fueron tratados con ambos injertos. La presencia de más vasos sanguíneos fue en los sitios

tratados con sulfato de calcio. Esto podría ayudar a explicar los buenos resultados divulgados en la literatura con el uso de este material.

En el campo de la medicina, especialmente en cirugía general, el uso de sulfato de calcio como relleno de cavidades óseas post- quirúrgicas, Ej.: quistes, tumores, etc., han sido de primera elección debido a su gran rigidez después del fraguado y de su larga permanencia debido a su lenta reabsorción, disminuyendo así grandes pérdidas óseas y fracturas patológicas.

En el campo de la odontología, en especial con la aparición de los implantes, el uso del sulfato de calcio genero inconvenientes debido a su lenta reabsorción, ya que generalmente el hueso regenerado es utilizado como sostén y mantenimiento de los implantes. Esto trae como inconveniente la postergación de las cirugías en la colocación de implantes mediatos. Es por esto que los investigadores comenzaron a utilizar el sulfato de calcio en forma de partículas de menor tamaño y mayor porosidad, para acelerar su reabsorción y reemplazo por hueso cicatrizal. Estudios en conejos donde fueron injertados con sulfato de calcio en forma de partículas y cemento, han demostrado histológicamente en las primeras fases de cicatrización una actividad osteoclástica intensa, y en algunos casos la matriz osteoide estaba presente. Después de 4 semanas el grupo que fue tratado con cemento presentaban vestigios del material, en cambio el grupo tratado con partículas fueron reabsorbidos en su totalidad. En cuanto a la cantidad y calidad de regeneración no se encontraron diferencias significativas en ambos grupos, aunque se recomienda el uso de partículas no solo para acelerar el proceso de reabsorción, sino para evitar la exotermia de fraguado del material.

Por ultimo, hay que tener en cuenta que no solo importa la cantidad de regeneración ganada, sino también la calidad regenerada. El sulfato de calcio en todos los trabajos realizados, no se encontraron resultados alentadores en cuanto a la calidad ósea. El objetivo de este trabajo es incorporar al sulfato una gran cantidad de minerales óseos para mejorar la mineralización del hueso regenerado, y acelerar aun más su reabsorción.

OBJETIVOS

- Identificar factores que favorezcan la neoformación ósea.
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento del Sulfato de Calcio en partículas como biomaterial osteoconductor.
- Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento del sulfato de calcio en partículas enriquecido con minerales como biomaterial osteoconductor.
- Diseñar una estrategia terapéutica frente a los defectos estructurales del hueso.

HIPOTESIS

Los defectos óseos responden de manera diferente en cuanto a la calidad y cantidad de regeneración, según sean tratados con el Sulfato de Calcio solo o enriquecido con minerales.

MATERIAL Y METODOS

I) DISEÑO DEL ESTUDIO

TIPO DE ESTUDIO: Experimental cuantitativo.

VARIABLES:

Variables Independientes:

- Sulfato de Calcio en partículas solo
- Sulfato de Calcio en partículas enriquecido con minerales

Variables Dependientes:

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

UNIVERSO Y MUESTRA:

Se utilizarán 30 ratas endocriadas de cepa Fisher (F344/N) provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

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

METODOS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS:

- Observación directa.
- Estudios histológicos realizados por computadora.

PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS:

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

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

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

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

II) DESARROLLO DE LA METODOLOGIA (MODELO ANIMAL)

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

1) Elección del animal. Fundamentación

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

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

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

2) Elección de la anestesia.

Las dos primeras ratas anestesiadas sufrieron paro cardiorespiratorio, lo que nos obligo disminuir la dosis de Ketamina a 60 mg/ Kg de peso (Dosis Usual 75 mg/kg de peso) logrando así una muy buena anestesia quirúrgica, de unos 20 a 30 minutos de duración, y con una recuperación sin problemas.

La dosis de Xilacina se utilizo la usual (10 mg/ kg de peso).

Se escogió la vía IM por sobre la IP, por ser de ejecución mas simple.

Los riesgos de una y otra han sido bien descriptos, e incluyen miositis (IM) e infecciones (IP). Sin embargo, ninguno de estos problemas ocurrió en nuestra experiencia.

3) **Acto operatorio.**

a) *Depilación de la zona a trabajar.* Fue realizada a mano tirando de los pelos suavemente, sin problemas, probablemente por efecto del estado de relajación durante la anestesia.

b) *Incisión.* Se realiza en piel. Por palpación se identifica el fémur, y el largo del mismo, a partir de distinguir las articulaciones femoro-tibial y coxo-femoral. En base a esto se traza una incisión en piel del largo adecuado.

c) *Divulsión del plano muscular.* Se realiza con tijeras con punta roma con el objetivo de no lesionar la arteria femoral.

Una vez expuesto el hueso colocamos dos separadores de Farabeuf produciendo la separación del plano muscular.

Por ultimo, eliminamos el periostio con un periostotomo, dejando la zona a intervenir bien limpia.

d) *Creación de los defectos óseos.* Se realizó una perforación de 9 mm de largo, por 3 mm de ancho y 3 mm de profundidad, mediante fresas redondas de 3 mm de diámetro montadas en un motor eléctrico de cirugía y con abundante refrigeración acuosa para evitar el recalentamiento del hueso.

Una vez conformados los mismos, los animales correspondientes a los grupos experimentales fueron tratados con los sustitutos óseos a investigar, mientras que el grupo control no recibió tratamiento.

e) *Sutura*. Se suturan los dos planos, primero el muscular y por ultimo la piel.

Para el plano muscular utilizamos hilo de seda no reabsorbible, ya que es mas económico que el hilo reabsorbible de colágeno y el tiempo restante para la eutanasia de los animales es corto (1 mes).

La sutura en piel se realizo con tanza ya que en trabajos anteriores cuando fue utilizado el hilo de seda, hubo desprendimiento de los puntos en algunos casos.

4) Postoperatorio.

a) *Postoperatorio inmediato y recuperación de la anestesia*. Debido a que tuvimos que disminuir la dosis usual de la ketamina, esto nos disminuyo el tiempo de trabajo, ya que aproximadamente a los 40 minutos de aplicar la anestesia, los animales comenzaron a despertar de la anestesia.

b) *Medicación posoperatoria y alimentación*. Para el control del dolor se les administro vía IM acido acetilsalicílico.

La alimentación de los mismos fue con alimento balanceado comercial autoclavado y agua estéril para contrarrestar la deshidratación ocasionada por la anestesia.

c) *Complicaciones postoperatorias*. Tuvimos dos tipos de complicaciones, uno en cada animal. En uno, la fractura del fémur, producido por el debilitamiento del mismo, ya que el defecto creado es muy critico y, en otro hubo una formación de absceso.

Esto nos obligo a operar dos animales más para contrarrestar este inconveniente.

d) *Postoperatorio mediato*. Los animales permanecieron alojados bajo observación en el pabellón de animales de experimentación de la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, manteniéndose el régimen de temperatura y alimentación balanceada.

5) Obtención y procesado de las muestras.

Luego de 30 días los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono y sus fémures resecados para realizar los preparados para microscopia.

El acceso a los fémures fue el mismo que fue utilizado para la cirugía inicial. Se desprendieron todas las inserciones musculares alrededor del fémur, y luego con tijera de cirugía, se realizó los cortes de los ligamentos correspondientes a las articulaciones, para separar el fémur por completo.

Por último con bisturí convencional se comenzó un raspado de la superficie para desprender algunas inserciones musculares evitando que estas nos dificulten su procesado para la histología.

Las muestras fueron fijadas en formol al 10 % a 4^a C en frascos porta implantes dentales y luego fueron trasladadas a la Cátedra de Patología General de la FCVLP, donde se las incluyó en EDTA para su descalcificación.

Posteriormente fueron incluidas en parafina para conformar los tacos, a partir de los cuales se obtuvieron los cortes con micrótopo, para ser montadas en portaobjetos donde finalmente fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina.

6) Evaluación de los resultados.

Las muestras fueron capturadas mediante una cámara de video (Sony DXC-151A) montada sobre un microscopio óptico (Olympus SZ 40) y posteriormente digitalizados mediante una placa digitalizadora (Flashpoint 128, Integral Technologies, USA) y procesadas con un analizador digital de imágenes (ImagePro Plus v4.1. - Media Cybernetics, USA) para calcular el grado de regeneración obtenido. La resolución de las imágenes fue de 640 x 480 pixels.

Los distintos elementos de la imagen histológica fueron segmentados en base al color de la tinción.

La evaluación comparativa de los resultados entre los tres grupos esta hecha de acuerdo a la superficie total de hueso regenerado.

Estos estudios se llevaron a cabo en el Servicio de Microscopía de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

III. METODOLOGIA

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

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

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

Todas fueron operadas bajo anestesia general con ketamina/xilacina 60 mg/kg + 10 mg/kg por vía IM (Fig. 31, 32 y 33). Se utilizó un motor de cirugía eléctrico con irrigación de solución fisiológica incorporada (Steri-Oss), pieza de mano recta, fresa redonda de 3 mm de diámetro e instrumental quirúrgico para el acceso al hueso (Fig. 34, 35 y 36).

Se depiló la piel en la zona del fémur, luego se realizó una incisión en piel con bisturí y se continuó en el plano muscular con tijeras por divulsión, hasta identificar el hueso (Fig. 37, 38 y 39).

Una vez limpio y retirado el periostio, se realizó una perforación de 9 mm de largo, por 3 mm de ancho y 3 mm de profundidad (Fig. 40). Al grupo 1 se le injertó sulfato de calcio, al grupo 2 sulfato de calcio enriquecido con

minerales y el grupo 3 no recibió tratamiento quedando como grupo control (Fig. 41 y 42).

Una vez finalizado, se realizó una sutura por planos (Fig. 43 y 44).

El Sulfato de Calcio en partículas se realizó mediante el fraguado del mismo en polvo al combinarlo con solución fisiológica estéril, y se generó posteriormente las partículas por fragmentación. El enriquecimiento con minerales se efectuó combinando un 50% de polvo de sulfato de calcio y un 50% de minerales en polvo y luego produciendo el fraguado como en el caso anterior. El polvo de minerales está compuesto por un 50% de calcio; 35% de fósforo; 10% de carbonato; 1,5 % de magnesio; 1,5% de flúor; 1% de potasio; y 1% de sodio (Fig. 45, 46, 47 y 48).

Durante el postoperatorio, los animales permanecieron alojados bajo observación en el pabellón de Animales de Experimentación de la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

A los 30 días los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono, y los fémures resecados mediante cortes con tijera sobre los ligamentos de las articulaciones. Luego las muestras fueron fijadas en formol al 10% a 4°C, descalcificadas en EDTA, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo, montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina eosina, para su posterior observación a través de un microscopio óptico.

Los preparados fueron capturados mediante una cámara de video (Sony DXC-151A) montada sobre un microscopio óptico (Olympus SZ 40) y posteriormente digitalizados mediante una placa digitalizadora (Flashpoint 128, Integral Technologies, USA).

Por ultimo se recolectaron las muestras y fueron evaluadas con un analizador digital de imágenes (ImagePro Plus v4.1. - Media Cybernetics, USA) para calcular el grado de regeneración obtenido. Los distintos elementos de la imagen histológica fueron segmentados en base al color de la tinción, y posteriormente calculada su superficie de hueso nuevo regenerado, así como el patrón arquitectónico dentro de los límites del defecto creado. La superficie se expresa en mm², mientras que la arquitectura se considero: Buena (Regeneración completa con patrón trabecular bien definido); Aceptable (Regeneración completa con patrón trabecular mas irregular); Mala (Regeneración incompleta).

Estos estudios se llevaron a cabo en el Servicio de Microscopía de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.



Fig. 30. Animales alojados en sus respectivas cajas.



Fig. 31. Balanza para dosificar la cantidad de anestesia a utilizar según el peso del animal.



Fig. 32. Ketamina, anestésico.



Fig. 33. Xilacina, sedante.



Fig. 34. Motor para cirugía.

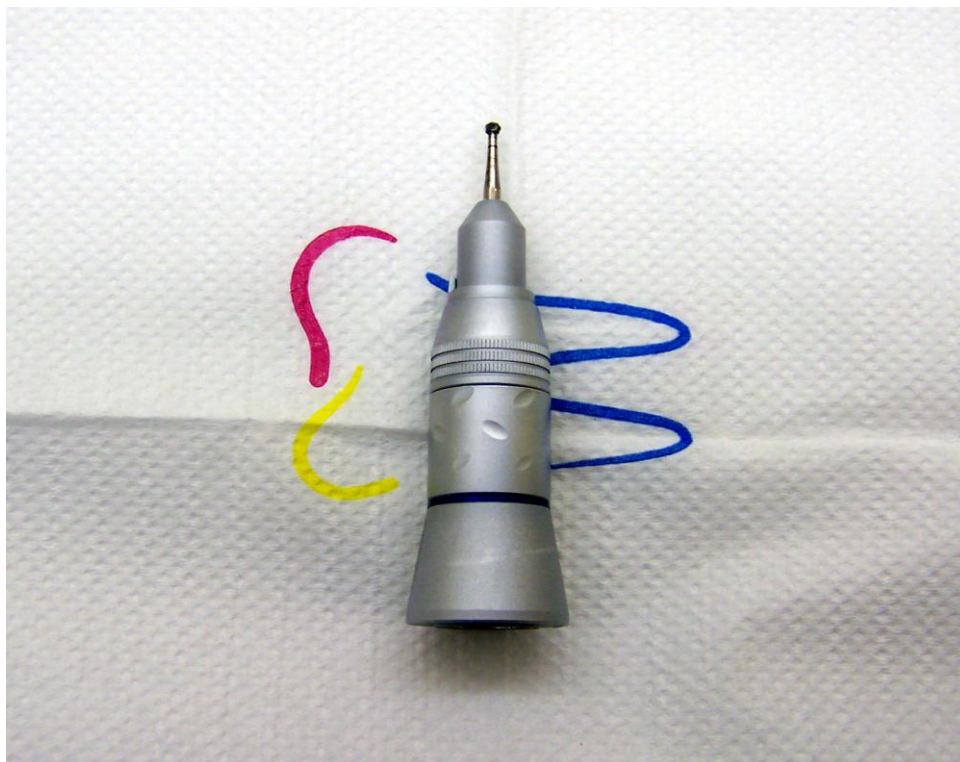


Fig. 35. Pieza de mano recta y fresa redonda de 3 mm de diámetro.

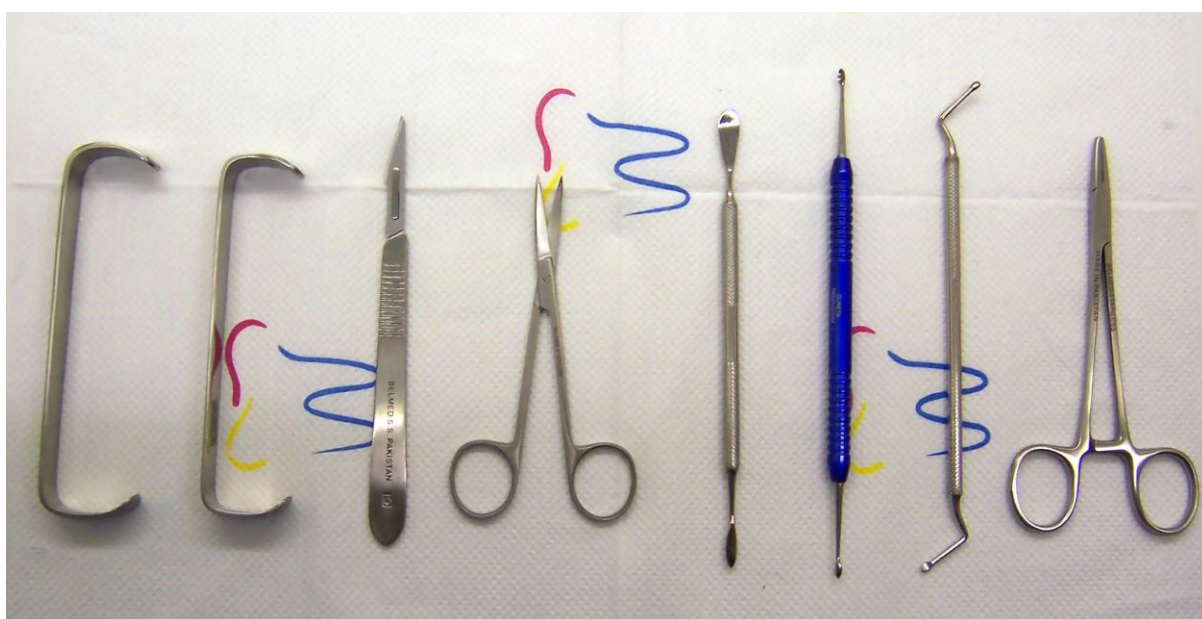


Fig. 36. Instrumental utilizado para operar.



Fig. 37. Área de trabajo depilada.



Fig. 38. Incisión en piel con bisturí.



Fig. 39. Divulcion del plano muscular.

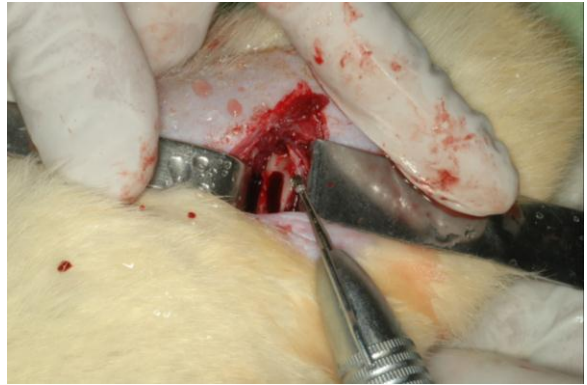


Fig. 40. Creacion del defecto.



Fig. 41. Colocación del injerto.



Fig. 42. Defecto rellenado.

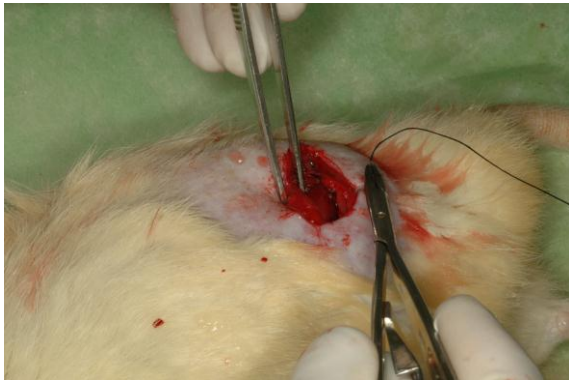


Fig. 43. Sutura del plano muscular.



Fig. 44. Sutura de la piel.



Fig. 45. Sulfato de Calcio de grado medico



Fig. 46. Bloque del materia luego del fraguado y fragmentación.



Fig. 47. Material particulado.



Fig. 48. Envasado previo a esterilización.

RESULTADOS

El modelo experimental desarrollado ha funcionado correctamente y no hubo inconvenientes en su ejecución.

El material logrado de Sulfato de Calcio solo y enriquecido con materiales presentó una consistencia blanda, fácil de manipular, buena porosidad con gran capacidad de embeberse en sangre y mostró buena tolerancia.

La producción del mismo es relativamente sencilla y económica. Se observó que en el caso del enriquecido con minerales, la estructura resultó en una aparente mayor porosidad, con respecto al sulfato de calcio solo.

Asimismo, la incorporación de dichos minerales aceleró la reacción de fraguado del material.

Macroscópicamente en el grupo 2, se pudo determinar la formación completa del defecto óseo, notándose la presencia de partículas del injerto en el mismo (Fig. 49 y 50). En el grupo 1, se observó una formación incompleta, en grados variables, y escasos restos del injerto, aparentemente por una reabsorción muy veloz. En el grupo 3, no se produjo regeneración, quedando una amplia cavidad residual.

Microscópicamente, en la evaluación inicial de ambos grupos experimentales, no se observan reacciones inflamatorias importantes, ni signos de encapsulamiento fibroso del material, lo cual lo sitúa como biocompatible.

Asimismo, en el grupo 2, histológicamente se observa la regeneración completa de los defectos, con formación de trabéculas de grosores variables e interconectividad entre las mismas. La superficie regenerada, en mm² para

el grupo 1 fue de 9,270 (0,378), para el grupo 2 de 10,865 (0,358) y para el grupo 3 de 4.370 (0,549). (Fig. 51, 52 y 53). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la superficie regenerada en el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($P = 0,022$).

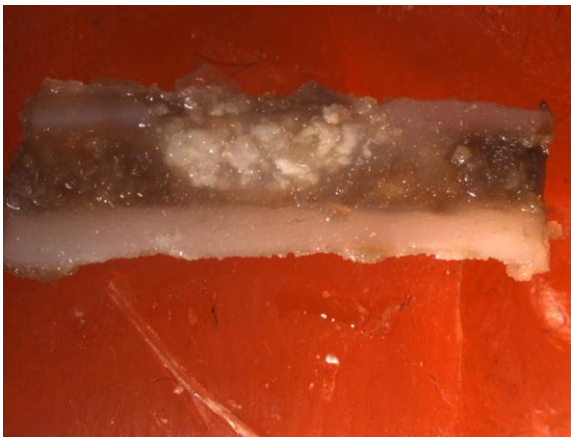


Fig. 49. Injerto en el grupo 2 llenando la totalidad del defecto.

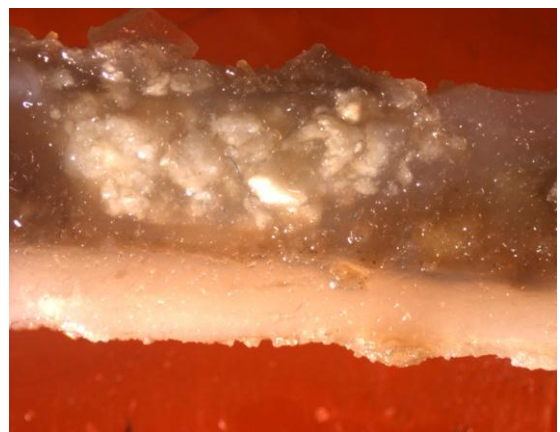


Fig. 50. Misma muestra a mayor aumento.

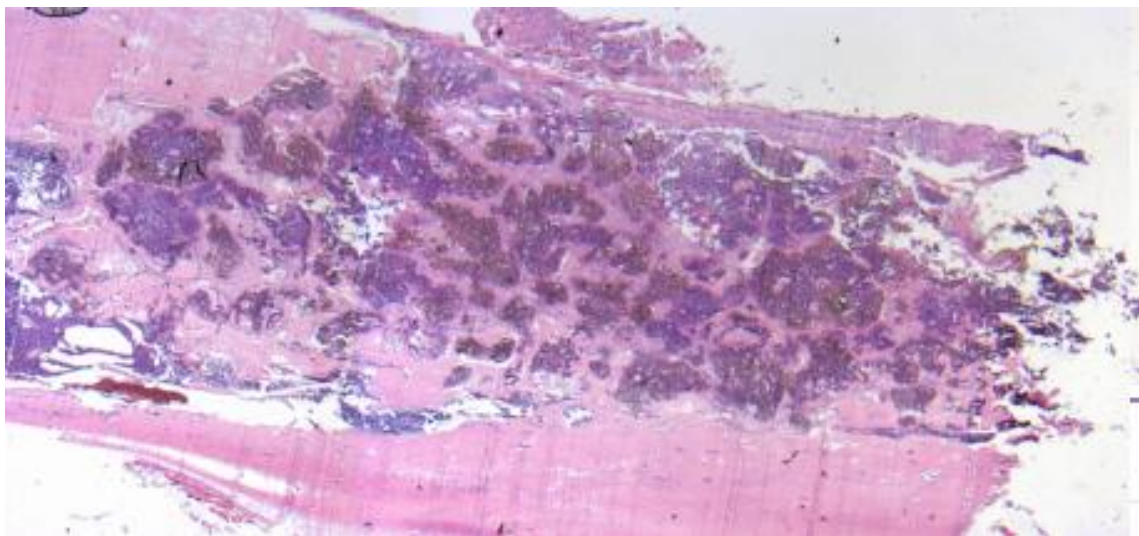


Fig. 51. Microfotografía de muestra del grupo 2, donde se observa histológicamente la regeneración completa del defecto creado.

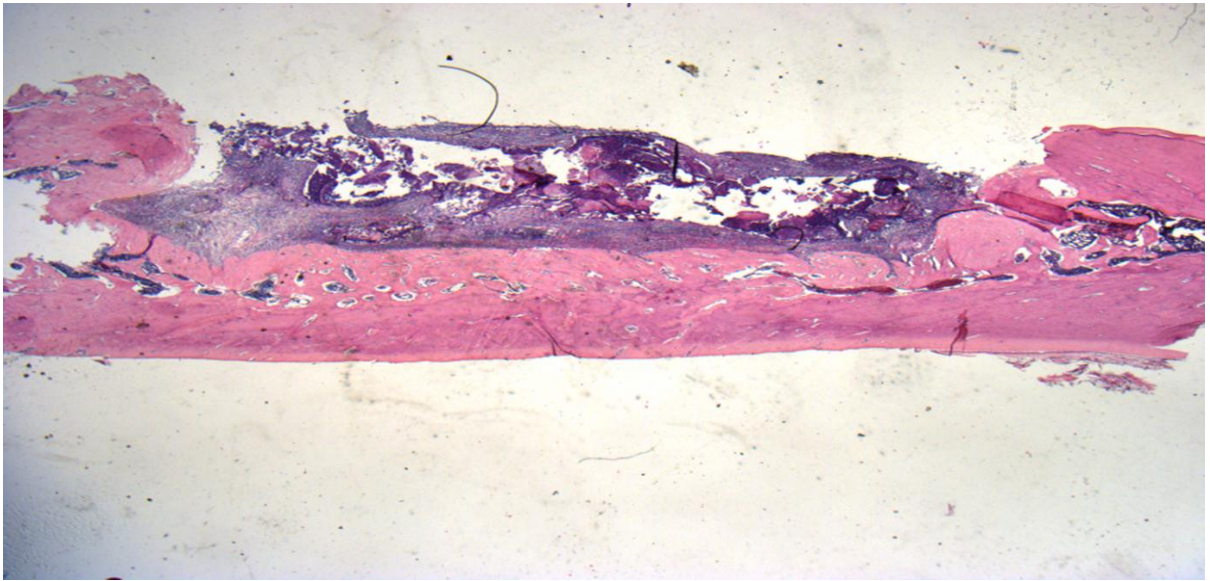


Fig. 52. Microfotografía de muestra del grupo 1 donde se observa una formación incompleta del defecto posiblemente a la veloz reabsorción del material.

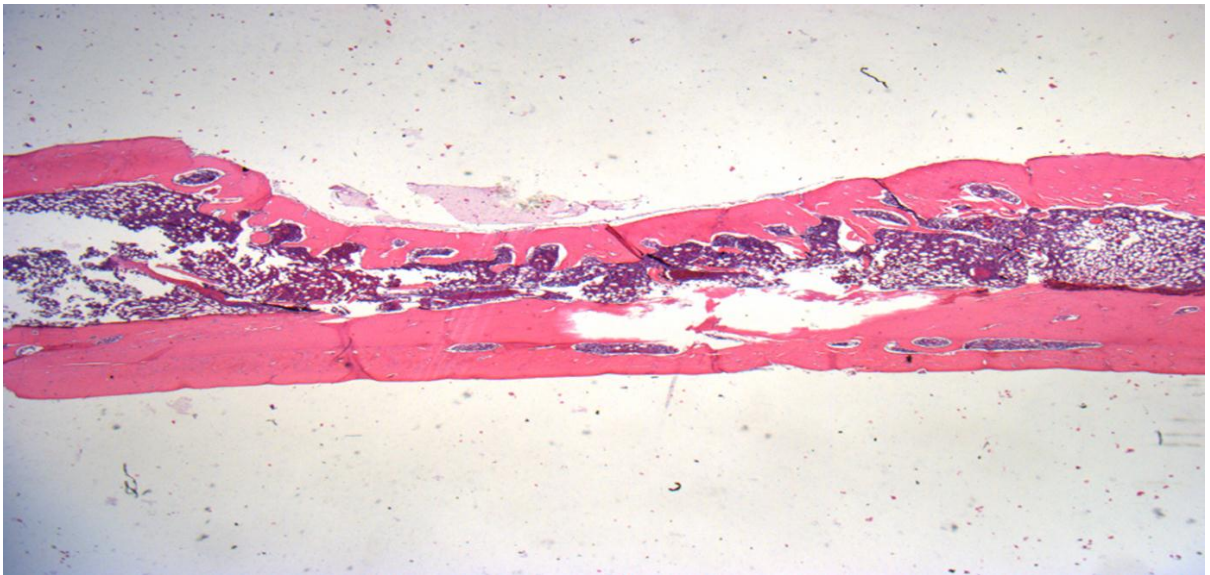


Fig. 53. Microfotografía de muestra del grupo 3 donde no se produjo regeneración, quedando una amplia cavidad residual.

DISCUSION

Las discusiones sobre los resultados obtenidos al desarrollar el plan se comentan a continuación:

1) Elección del animal, de la edad y el sexo.

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

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

La cepa seleccionada fue la Fisher 344 (F344/N) ya que las mismas tenían una mejor recuperación de la anestesia con respecto a la cepa Wistar durante pruebas realizadas previamente para el ajuste de la anestesia.

Todos los animales tenían que superar las 16 semanas de edad, teniendo aproximadamente 500 gramos de peso debido a que necesitábamos un fémur de un tamaño considerable para efectuarle un defecto crítico.

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

2) Elección de la anestesia y ajuste de Dosis.

Las dos primeras ratas anestesiadas sufrieron paro cardiorrespiratorio, lo que nos obligo disminuir la dosis de Ketamina a 60 mg/ Kg de peso (Dosis Usual 75 mg/kg de peso) logrando así una muy buena anestesia quirúrgica, de unos 20 a 30 minutos de duración, y con una recuperación sin problemas. La dosis de Xilacina se utilizo la usual (10 mg/ kg de peso).

Se escogió la vía IM por sobre la IP, por ser de ejecución mas simple.

Los riesgos de una y otra han sido bien descriptos, e incluyen miositis (IM) e infecciones (IP). Sin embargo, ninguno de estos problemas ocurrió en nuestra experiencia.

3) Diseño de los defectos óseos e instrumental utilizado.

Se opto por realizar un defecto de 9 mm de largo, por 3 mm de ancho y 3 mm de profundidad con el objetivo de conseguir un defecto critico que luego nos permita obtener muestras fácilmente detectables a simple vista al realizar los cortes con micrótopo durante el procesado histológico. En pruebas pilotos se crearon defectos más grandes en ancho y largo debilitando así la cortical del fémur produciendo la fractura del mismo en algunos de los casos.

Las perforaciones se realizaron mediante fresas redondas de 3 mm de diámetro montadas en un motor eléctrico de cirugía y con abundante refrigeración acuosa para evitar el recalentamiento del hueso. Se utilizaron estas fresas ya que por su diámetro al realizar las tres perforaciones en forma contigua nos quedaba el defecto deseado.

4) Elección de la sutura.

Para el plano muscular utilizamos hilo de seda no reabsorbible, ya que es más económico que el hilo reabsorbible de colágeno y el tiempo restante para la eutanasia de los animales es corto (1 mes).

La sutura en piel se realizó con tanza ya que en trabajos anteriores cuando fue utilizado el hilo de seda, hubo desprendimiento de los puntos en algunos casos.

3) Sulfato de Calcio.

El sulfato de calcio tiene una larga, y controvertida, historia de uso en medicina y odontología. Muchos investigadores, como Puleo DA y Al-Sabbagh M. han demostrado que el Sulfato de Calcio es un material biocompatible y que es reabsorbido totalmente después de la implantación pero no crea un entorno rico de calcio, aunque se pudo demostrar que estos iones de calcio pueden proporcionar un cierto estímulo a los osteoblastos. Melo LG, Nagata MJ, Bosco AF, Ribeiro LL, y Leite CM mediante un estudio histológico e histométrico en tibias de la rata, demostraron que el uso de Sulfato de calcio como barrera en defectos quirúrgicos injertados con cristales bioactivos tenían considerablemente más formación de hueso que el grupo que utilizó el cristal bioactivo solamente, 30 días después de las cirugías, afirmando así que el Sulfato de Calcio se puede utilizar como osteoconductor en la regeneración ósea.

4) Minerales óseos.

El tejido óseo está compuesto por una matriz inorgánica (70 %) y orgánica (30 %).

Los componentes inorgánicos del tejido óseo están compuestos por depósitos de fosfato de calcio cristalino. Los cristales son idénticos a los del mineral hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Además del fosfato de calcio, el mineral de los huesos contiene numerosos iones diferentes, entre ellos el magnesio, potasio, sodio, carbonato, citrato, fluoruros, hierro, zinc, etc.

Debido a que la reabsorción del Sulfato de Calcio no haya creado un rico entorno de Calcio se optó por la incorporación de minerales óseos donde se mejoraron las propiedades del hueso cicatrizal haciéndolo más denso y aceleró la remineralización ósea por la sola presencia del mineral. Cabe destacar que al incorporar los minerales a Sulfato de Calcio le proporcionó a la estructura una mayor porosidad siendo este fácilmente embebido por sangre.

Todo material de sustitución ósea tiene un objetivo fundamental, que es actuar como matriz para el crecimiento del hueso, y luego de esto ser reabsorbido hasta ser reemplazado totalmente por tejido óseo vivo. Una matriz ideal debería ser lo más porosa posible, para favorecer la revascularización, pero a la vez no tanto para que no se reabsorba antes de cumplir su cometido.

En este sentido, nuestro trabajo muestra como el sulfato de calcio solo se ha reabsorbido antes del tiempo necesario. Mientras tanto, en el combinado con minerales la reabsorción fue más lenta, siendo interesante destacar, como mencionamos al principio, que esta combinación poseía una mayor porosidad, al menos hasta el nivel de detalle evaluado al momento.

Por último, cabe agregar que la materia prima de la cual se hace el sulfato de calcio es relativamente barata y abundante. En el caso de que estos

resultados sean confirmados en pruebas clínicas, podríamos disponer de un nuevo biomaterial, mucho más económico que los disponibles actualmente.

CONCLUSIONES

Dentro de los límites de este estudio se puede concluir lo siguiente:

- Ambos injertos fueron biocompatibles y no hubo rechazos en ninguno de los casos.
- La manipulación fue sencilla y gracias a su capacidad de embeberse en sangre mantuvo la arquitectura una vez injertada cuando fue tratado con ambos sustitutos.
- El material posibilitó la regeneración completa de un defecto crítico cuando fue tratado con Sulfato de Calcio enriquecido con minerales.
- No se recomienda el uso solo de Sulfato de calcio, sino combinado con otros sustitutos, preferentemente el hueso autólogo u otros sustitutos, por ejemplo el Fosfato Tricalcico.
- Mayores estudios, así como pruebas clínicas de este material podrían darnos mayor información en cuanto a la capacidad de su uso como sustituto a los injertos óseos autólogos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Fernández E, Vlad MD, Gel MM et al.** *Modulation of porosity in apatitic cements by the use of alpha-tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures.* Biomaterials. 2005 Jun;26(17):3395-404.
2. **Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC.** Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2002 Jan-Feb;17(1):86-94
3. **Lorenzoni, M; Pertl, C; Keil, C et al.** "Treatment of peri-implant defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study with various membranes and bone grafts". Int J Oral Maxillofac Implants 1998;13(5):639-46
4. **Luchetti, C.** " *Injertos Autólogos, Alógenos, Xenógenos y Sintéticos en el Tratamiento de Grandes Defectos Estructurales del Hueso* " Revista Argentina de Osteología, 2005, 4 (1): 9 – 23
5. **Luchetti, C; Ayala, M.** "Eficacia del Pamidronato Disódico en Regeneración Ósea Guiada" Revista del Circulo Odontológico de Rosario, 2003, 67 (1): 11-16
6. **Manjubala I et al.** "Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition." J Biomed Mater Res. 2002;63(2):200-8.
7. **Marks Jr, SC; Hermey, DC.** "The Structure and Development of Bone" En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. "Principles of Bone Biology" 1996, Academic Press, pags. 3-14

8. **Moore WR, Graves SE, Bain GI.** "Synthetic bone graft substitutes". ANZ J Surg. 2001 Jun;71(6):354-61
9. **Murashima Y, Yoshikawa G, Wadachi R, Sawada N, Suda H.** Calcium sulphate as a bone substitute for various osseous defects in conjunction with apicectomy. Int Endod J 2002 Sep;35(9):768-74
10. **Nidoli MC; Nielsen FF; Melsen B** "Endochondral vs. intramembranous demineralized bone matrices as implants for osseous defects". J Craniofac Surg 1999 May;10(3):177-85
11. **Nilsson M, Wang JS, Wielanek L et al.** *Biodegradation and biocompatibility of a calcium sulphate-hydroxyapatite bone substitute.* J Bone Joint Surg Br. 2004 Jan;86(1):120-5.
12. **Phang MY, Ng MH, Tan KK et al.** *Evaluation of suitable biodegradable scaffolds for engineered bone tissue.* Med J Malaysia. 2004 May;59 Suppl B:198-9.
13. **Rabie AB; Chay SH** Clinical applications of composite intramembranous bone grafts Am J Orthod Dentofacial Orthop 2000 Apr;117(4):375-83
14. **Rabie AB; Chay SH; Wong AM** "Healing of autogenous intramembranous bone in the presence and absence of homologous demineralized intramembranous bone". Am J Orthod Dentofacial Orthop 2000 Mar;117(3):288-97
15. **Rabie AB; Wong RW; Hagg U** "Composite autogenous bone and demineralized bone matrices used to repair defects in the parietal bone of rabbits." Br J Oral Maxillofac Surg 2000 Oct;38(5):565-570
16. **Coetzee AS** "Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate". Arch Otolaryngol 1980 Jul;106(7):405-9

17. **Pecora G; Andreana S; Margarone JE 3rd; Covani U; Sottosanti JS**
“Bone regeneration with a calcium sulfate barrier”. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997 Oct;84(4):424-9
18. **Orsini G; Ricci J; Scarano A; Pecora G; Petrone G; Iezzi G; Piatelli A**
“Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit”. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2004 Feb 15;68(2):199-208.
19. **Strocchi R; Orsini G; Iezzi G; Scarano A; Rubini C; Pecora G; Piatelli A** “Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits”. J Oral Implantol 2002;28(6):273-8
20. **Melo LG; Nagata MJ; Bosco AF; Ribeiro LL; Leite CM** “Bone Healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias”. Clin Oral Implants Res 2005 Dec; 16(6):683-91
21. **Thomas MV; Puleo DA; Al-Sabbagh M** “Calcium sulfate: a review”. J Long Term Eff Med Implants 2005;15(6):599-607
22. **Sbordone L; Bortolaia C; Perrotti V; Pasquantonio G; Petrone G**
“Clinical and histologic analysis of calcium sulfate in treatment of a post-extraction defect: a case report”. Implant Dent 2005 Mar;14(1):82-7
23. **Guarnieri R; Aldini NN; Pecora G; Fini M; Giardino R** “Medial-grade calcium sulfate hemihydrate (surgiplaster) in healing of a human extraction socket-histologic observation at 3 months:a case report”. Int J Oral Maxillofac Implants 2005 Jul-Aug;20(4):636-41

24. **Cingolani HE; Houssay AB** “Metabolismo del calcio y del fosforo”.

Libro de Fisiología Humana 2004 Feb;47(7):593-612

25. **Geneser F** “Tejido esquelético”. Libro de Histología Humana 2003

Sep;12(3):263-299

26. **Bianchi A**

27. **Bechelli A**