

Modelo experimental de la respuesta ósea a xenoinjertos de origen bovino. Estudio radiográfico e histomorfométrico*

Experimental models of bone response to bovine xenograft radiographic and histomorphometric *

Rafael Arcesio Delgado Ruíz ¹
José Luis Calvo Guirado ²
María Piedad Ramírez Fernández ³
Jose Eduardo Maté Sánchez del Val. ⁴
Gerardo Gómez Moreno ⁵
Javier Guardia ⁶

ABSTRACT

Objective To carry out a radiological and histomorphometric evaluation of bone response to bovine bone implants inserted in rabbits' tibiae. **Methods** Twenty New Zealand rabbits weighing 3900–4500 g were used. Twenty bovine bone implants (Endobons) in granulated form of 500–1000 mm granulometry were inserted in the proximal metaphyseal area of the animals' right tibia and 20 control areas were located in the proximal metaphyseal area. Following implantation, the animals were sacrificed in four groups of five, after 1 month, 2 months, 3 months and 4 months, respectively. Anteroposterior and lateral radiographs were taken. Samples were sectioned at 5 mm and stained using Hematoxylin–Eosin and Masson's trichromic. **Results** After 4 months, radiological images showed complete repair of the bone defects. No healed or residual bone alterations attributable to the presence of the implant were observed. Histomorphometric analysis at 4 months showed the presence of a higher density of newly formed bone with mean values for new bone, residual graft material and non-mineralized connective tissue of $22.8 \pm 1.5\%$, $39.4 \pm 2.3\%$ and $37.7 \pm 2.5\%$. There were no statistically significant differences in the length of cortical formation with bovine bone, $98.8 \pm 1.1\%$, compared with the control group, $99.1 \pm 0.7\%$, at the end of the study period. **Conclusions** The biomaterial used in the study was shown to be biocompatible, osteoconductive and non-resorbable and as such a possible bone substitute that does not interfere with normal reparative bone processes.

RESUMEN

Objetivo Evaluar la respuesta ósea a injertos de origen bovino insertados en tibia de conejos mediante técnicas radiográficas e histomorfométricas. **Materiales y métodos** Estudio experimental en el que se emplearon veinte conejos de Nueva Zelanda con un peso entre 3900–4500 g. Veinte injertos de hueso bovino en polvo, con un tamaño de partícula de 500–1000 mm fueron insertados en defectos óseos de 4 mm de diámetro en la metafisis proximal de la tibia derecha, y veinte defectos con las mismas dimensiones fueron realizados como control en la metafisis proximal de la tibia izquierda. Los animales fueron sacrificados en grupos de cinco al cabo de 1, 2, 3, y 4 meses. Se tomaron radiografías anteroposteriores y laterales. Las muestras fueron seccionadas y teñidas con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. **Resultados** Al cabo de 4 meses, las imágenes radiográficas mostraron la reparación completa de los defectos óseos sin alteraciones atribuibles a la presencia del injerto. El análisis histomorfométrico a los 4 meses mostró valores de $22.8 \pm 1.5\%$ para el hueso nuevo, $39.4 \pm 2.3\%$ para el material de injerto residual y $37.7 \pm 2.5\%$ para el tejido conectivo no calcificado. No hubo diferencias significativas en el cierre cortical con hueso bovino $98.8 \pm 1.1\%$ comparado con los controles $99.1 \pm 0.7\%$ al final del período de tiempo estudiado. **Conclusiones** El biomaterial utilizado en este estudio mostro ser biocompatible, osteoconductor, poco reabsorbible y puede ser considerado como un sustituto óseo que no interfiere con el proceso normal de reparación del hueso.

Keywords Biomaterials, Bone substitutes, Xenografts, Histology, Digital Radiography.

Palabras clave Biomateriales, Sustitutos Óseos, Xenoinjertos, Histología, Radiografía digital.

¹ Dds, MsC, PhD. Profesor Asociado Patología y Terapéutica Dental. Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Murcia. Correspondencia: Clínica Odontológica Hospital Morales Meseguer. 2da Planta. +34868888583. Murcia-España. Correo electrónico: raderu78@gmail.com.

² Dds, MsC, PhD. Profesor Titular. Clínica Integrada del Adulto, Director Master Clínica Integrada, Implantología y Biomateriales. Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Murcia. Correspondencia: Clínica Odontológica Hospital Morales Meseguer. 2da Planta. Tel: +34868888583. Murcia-España. Correo electrónico: josecalvog@gmail.com.

³ Dds, MsC, PhD. Profesor colaborador, Master Clínica Integrada, Implantología y biomateriales. Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Murcia. Correspondencia: Clínica Odontológica Hospital Morales Meseguer. 2da Planta. Tel: +34868888583. Murcia- España. Correo electrónico: mpierrezfern@hotmail.com.

⁴ Dds, MsC, PhD. Profesor Asociado Patología y Terapéutica Dental, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Murcia. Correspondencia: Clínica Odontológica Hospital Morales Meseguer. 2da Planta. Tel: +34868888583 Murcia-España. Correo electrónico: jmsodont@hotmail.com.

⁵ Dds, MsC, PhD. Profesor Titular. Clínica de Pacientes Especiales. Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Granada. Colegio Máximo s/n Campus Universitario de Cartuja. Tel. +34 958 243 812. Granada - España. Correo electrónico: ggamezmreno@ugr.es.

⁶ Dds, MsC, PhD. Profesora Asociada. Clínica Integrada del Adulto. Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Granada. Colegio Máximo s/n Campus Universitario de Cartuja. Tel. +34 958 243 812. Granada-España. Correo electrónico: odonto__l@hotmail.com.

ANTECEDENTES

El reemplazo o sustitución del tejido óseo, ha sido objeto de una amplia investigación durante muchos años debido a su importancia en cirugía oral y maxilofacial, dada la necesidad de reponer el tejido óseo en ciertas situaciones (1-2). La tendencia terapéutica actual en traumatología como en odontología en cuanto a la regeneración de tejidos esta basada en la utilización de materiales artificiales o naturales que originen señales que estimulen e inicien la regeneración fisiológica (3-5), este proceso depende de tres mecanismos: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción.

El material sustituto ideal que ofrece estas tres características es el hueso autólogo, el "gold standard" para la regeneración (6-8). Sin embargo dadas las dificultades intrínsecas que envuelven la sustitución con hueso autólogo o con aloinjertos (9-11), es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas.

Los xenoinjertos a los que se han eliminado las grasas y las proteínas para reducir la respuesta inmune podrían ser una alternativa. Han demostrado ser biocompatibles y actualmente hacen parte de varios preparados de injertos óseos (12). Pueden ser de origen bovino (13-15), porcino (16-18) o equino (19).

El material de injerto utilizado en este estudio fué Endobon® RegenerOss (BIOMET3i). Es una hidroxiapatita porosa cerámica, que ha sido utilizada con éxito para la sustitución ósea en varias aplicaciones clínicas en procedimientos maxilofaciales y de ortopedia desde 1989 (20,21). Endobon® posee un amplio rango de aplicaciones que incluyen la reparación de defectos óseos en fracturas, quistes óseos, artrodesis y tumores óseos (22-25). Basados en estas premisas y dado el número de estudios previos que han demostrado la efectividad de los xenoinjertos como matrices osteoconductoras (26-32), el objetivo del presente trabajo es investigar este xenoinjerto de origen bovino como un posible sustituto para injertos óseos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio experimental fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Murcia y se realizó de acuerdo a la normativa española y a las directrices de la Comunidad Europea para el manejo de animales de experimentación. Un total de 20 injertos Endobon® (RegenerOss, Biomet 3i, Palm Beach Gardens, FL, USA) fueron insertados en el área de la metafisis proximal en la tibia derecha de 20 conejos albinos de Nueva Zelanda, de 30-35 semanas de edad y un peso entre 3900-4500gr. Quince minutos antes de la anestesia general, los animales recibieron una inyección intramuscular de 0.1-1mg/kg de maleato de acepromazina, un ansiolítico. La anestesia general incluyó 5-8mg/kg de Ketamina más Clorbutol intravenoso 0.5-1mg/kg, adicionalmente como coadyuvantes 0.5-1mg/kg de maleato de acepromazina y 0.05 mg/kg de atropina. Al final de la cirugía se aplicó una dosis única de Amoxicilina (0.1ml/kg intramuscular). El procedimiento quirúrgico se realizó en el área proximal de la metafisis de cada tibia, varios milímetros por debajo de la tuberosidad tibial anterior. Con una fresa redonda, se crearon dos defectos cóncavos de 4mm de diámetro a baja velocidad y con irrigación constante con suero fisiológico. El primer defecto se rellenó con el xenoinjerto granulado y el segundo se utilizó como control (Figura 1).

Los conejos fueron sacrificados en grupos de 5 mediante una sobredosis de thiopental intracardiaco así : primer mes (Grupo I), dos meses (Grupo II), tres meses (Grupo III) y 4 meses (Grupo IV) posteriormente a primera intervención quirúrgica.

ESTUDIO RADIOGRÁFICO

Dos radiografías una anteroposterior y una lateral fueron tomadas de la sección que contenía los defectos mediante el sistema de radiografía digital Kodak RVG 6100 (Kodak DS, Rochester, NY, USA), con los siguientes parámetros: 32kV, 40mA y un medidor automático de luz.

MICROSCOPIA ÓPTICA

Las muestras obtenidas se fijaron en formalina al 10% y se descalcificaron por medio de inmersión en Osteomol® (Merck KbaA, Whitehouse Station, NJ, USA) que contenía HCL (10%) y CH₂O (4%) durante 17 días, la solución se renovaba cada 24 horas. Posteriormente las muestras fueron embebidas en parafina, seccionadas a un espesor final de 5mm y teñidas con Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson, para revelar el hueso joven. Las muestras fueron analizadas bajo el microscopio óptico (Microphoto FXA, Nikon, Tokyo, Japan). La circunferencia completa de cada sección (incluyendo hueso, partículas de injerto y tejido conectivo) fueron trazadas manualmente para crear regiones de interés individuales.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

La evaluación histomorfométrica comprendió las mediciones de las áreas de hueso, y partículas de injerto bovino en relación al área total estudiada. La porción central de cada muestra fue seleccionada para disminuir el margen de error, en este sentido un margen de 1.5-2mm tanto de la porción coronal como apical fueron excluidos del análisis. La medición histomorfométrica se realizó mediante el software de análisis de imagen Image J, desarrollado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos de America. Se calcularon los porcentajes de: hueso nuevo, material de injerto residual y tejido conectivo no mineralizado. Para ello utilizamos un microscopio Nikon Eclipse 80i (Teknootik AB, Huddinge, Sweden), equipado con el sistema Easy Image 2000 (Teknootik AB, Huddinge, Sweden) con lentes 10x y 40x para la evaluación descriptiva de las muestras y para el análisis histomorfométrico respectivamente.

Para el cálculo del porcentaje de defecto cubierto, se generaron imágenes mediante un microscopio Leika Z6 APO (Barcelona, España), conectado a una cámara digital Leika DC 500 (Barcelona, España) y aumentado a 23X. Así se digitalizaron las imágenes de la zona del defecto y se realizaron mediciones de las áreas de interés con el software de análisis de imagen Leika Q Win V3 (Barcelona, Spain).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Primero se excluyeron factores individuales como diferencia individual de los injertos y posición como no significativos. Fueron aplicados test de normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y test para igualdad de varianzas (Mann-Whitney and Wilcoxon). El test de ANOVA para análisis de varianza fue utilizado para identificar diferencias entre medias mediante el programa SPSS 15.0 para Windows. Se calcularon los valores de Media y Desviación Estándar para cada variable. El valor de p asignado fue $p < 0.05$.

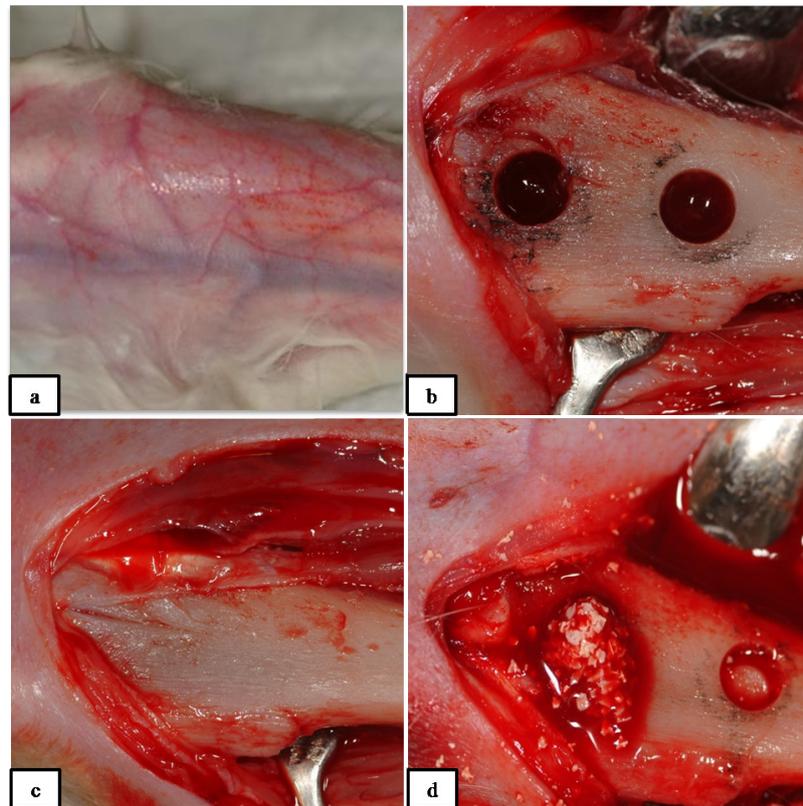


FIGURA 1.

(a) Zona proximal anterior de la tibia; (b) Incisión quirúrgica y tomando como referencia las protuberancias proximales y distales como referencia; (c) Perforaciones en la cortical de 4mm de diámetro hasta alcanzar el canal medular; (d) Material de injerto colocado en un orificio, el segundo orificio sin ningún material como control.

RESULTADOS

1 MES

ANÁLISIS RADIOGRÁFICO

Los defectos óseos control, mostraron depresiones cóncavas, radio transparentes de morfología redondeada o rectangular dependiendo de la imagen estudiada. Con los bordes del defecto homogéneos y claramente definidos. Las características del material injertado se apreciaban claramente como un elemento cilíndrico de 4mm por 6mm radio opaco dentro de la estructura de hueso trabecular en la cuál estaba injertado. (Figura 2b).

MICROSCOPIA ÓPTICA

El cambio característico más relevante en la zona de los controles fue una capa a nivel de la cortical de tejido de contenido fibrino-hemático que cubría los defectos. (Figura 2c, 2e y 2g).

En las áreas de grupos test se apreciaba la misma capa de tejido fibrino-hemático con un contenido adicional de gránulos del material de injerto. Se apreció la presencia de tejido

de granulación desde los bordes del defecto hacia el material de injerto, sustituyendo e invadiendo el mismo. Constituido por numerosos brotes capilares y endoteliales, con células mesenquimales de morfología irregular y gran citoplasma, y fibroblastos desorganizados en una matriz de sustancia fundamental amorfa, fibras colágenas, macrófagos y escasos linfocitos. (Figura 2d,2f y 2h).

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El hueso nuevo representó el $18.5 \pm 1.5\%$, el material residual de injerto $40.7 \pm 3.2\%$ y el tejido conectivo $40.8 \pm 3.1\%$. La longitud de formación de la cortical en los sitios del injerto fue de $63.7 \pm 3.7\%$ comparada con $90.1 \pm 0.7\%$ en los sitios control.

2 MESES

ANÁLISIS RADIOGRÁFICO

En los sitios control se aprecian algunas diferencias con relación al primer período estudiado, se apreciaron elementos lineares radiodensos similares a líneas trabeculares que no seguían los ejes de las fuerzas de carga de el hueso trabecular adyacente. Algunas de estas imágenes estaban enmarcadas por zonas de gran radiotransparencia. (Figura 3a). En las áreas rellenas de xenoinjerto, la cortical se apreció completamente reparada, siendo menos densa que en la cortical adyacente. (Figura 3b).

MICROSCOPÍA ÓPTICA

El grupo control mostró un notable fenómeno reparativo desde la periferia y alrededor de la médula ósea adyacente (Figura 3c, 3e y 3g). EL defecto cortical se apreció casi completamente cerrado por tejido óseo neoformado. Igualmente el material de injerto estaba rodeado de hueso trabecular mas extenso y mas ancho que el observado en el período anterior, con una apariencia reticular, no se apreció respuesta inflamatoria. (Figura 3d, 3f y 3h).

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El hueso nuevo representó el $21.7 \pm 1.5\%$, el material de injerto residual $39.7 \pm 3.1\%$ y el tejido conectivo $38.6 \pm 2.1\%$. La longitud de la cortical en los sitios del injerto fue de $84 \pm 3.7\%$ comparado con $92.3 \pm 1.9\%$ en los controles.

3 MESES

ESTUDIO RADIOGRÁFICO

En los controles las imágenes mostraron las mismas características que en el período anterior. (Figura 4a). Los rayos x revelaron la zona injertada con una densidad similar a la del hueso adyacente haciendo difícil la identificación del orificio original. No se pudieron apreciar bordes definidos entre el material y la cortical. (Figura 4b).

MICROSCOPÍA ÓPTICA

Se observó la reparación completa de la cortical con fenómenos de regeneración extendida al borde superior e inferior de la cortical adyacente. (Figura 4c, 4e y 4g). El estudio anamopatológico mostró hueso trabecular bien organizado con un incremento del remodelado, adicionalmente se observó un incremento en la formación de tejido adiposo y hematopoyético en la zona medular. (Figura 4d, 4f y 4h).

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El hueso nuevo se encontró en un $23.6 \pm 2.2\%$, el material de injerto residual en $38.9 \pm 3.5\%$, y el tejido conectivo en un $37.5 \pm 1.5\%$. La longitud de la formación de la cortical en los sitios del injerto fue de $95.7 \pm 2.3\%$, comparado con $96.5 \pm 2.1\%$ en los sitios control.

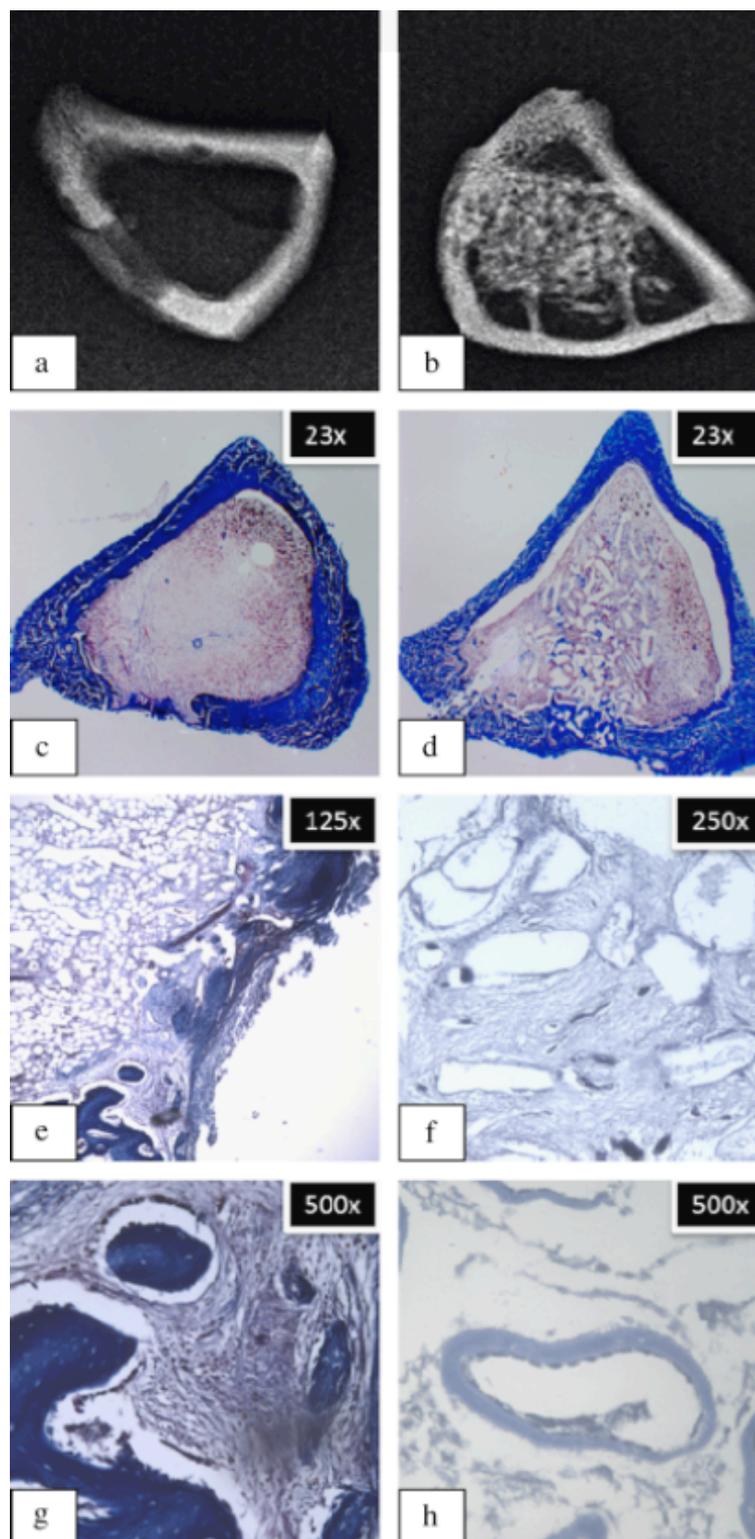


FIGURA 2

1 mes: (a) Sección transversal radiográfica (control), (b) Sección transversal radiográfica del área del injerto (Endobon®), (c) Imagen panorámica 23X, HE control. (d) Imagen panorámica 23X, HE Endobon®, (e) Detalle 125X, HE control. (f) Detalle 125X, TM Endobon®. (g) Mayor aumento 500X, HE control. (h) Mayor aumento 1000X – TM Endobon®. HE: Hematoxilina-eosina; TM: Tricrómico de Masson.

4 MESES

ESTUDIO RADIOGRÁFICO

Al fin del período del experimento en los sitios control las características fueron similares a las del período anterior, con la apariencia más notoria de trabeculado. (Figura 5a). En la zona del injerto se apreció una disminución en el volumen, reparación completa del defecto original y un trabeculado más denso, dando al área una apariencia reticular. No se apreciaron alteraciones atribuibles a la presencia del material de injerto. (Figura 5b).

MICROSCOPIA ÓPTICA

Se apreció un remodelado completo en los sitios injertados. El estudio anatomopatológico encontró la presencia de hueso maduro imposible de diferenciar del hueso adyacente. (Figura 5c, 5e y 5g). También se observó remodelado alrededor de la zona del injerto, mayor hacia la cortical. Se apreciaron cantidades incrementadas de hueso mineralizado y una disminución del material de injerto residual sin diferencias significativas con el período anterior. (Figura 5d, 5f y 5h).

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Nuevo hueso formado $27.5 \pm 2.4\%$, material residual $38.3 \pm 2.3\%$, tejido conectivo $34.2 \pm 3.4\%$. La longitud de formación de la cortical en los sitios del injerto fue de $98.8 \pm 1.1\%$, comparada con $99.1 \pm 0.7\%$ en los sitios control. La tabla 1 proporciona información de los valores medios de nuevo hueso formado, material residual y tejido conectivo para todos los períodos analizados. La longitud de formación de la cortical se incrementó gradualmente en todos los períodos, como se aprecia en la tabla 2.

TABLA 1

VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE HUESO NUEVO, MATERIAL RESIDUAL DE INJERTO Y TEJIDO CONECTIVO PARA CADA PERÍODO EVALUADO.			
	Hueso nuevo	Material Injerto Residual	Tejido Conectivo
	18.5±1.5%	40.7±3.2%	40.8±3.1%
1 mes	21.7±1.4%	39.7±3.1%	38.6±2.1%
2 meses	23.6±2.2%	38.9±3.5%	37.5±1.5%
3 meses	27.5±2.4%	38.3±2.3%	34.2±3.4%
4 meses	22.8±1.8%	39.4±3.0%	37.7±2.5%

TABLA 2

VALORES MEDIOS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR PARA LA LONGITUD DE LA CORTICAL FORMADA PARA CADA PERÍODO EVALUADO. (*P<0,05).		
	Longitud de la cortical formada	
	(Control)	(Xenoinjerto Bovino)
1 mes	90.1±0.7%	63.7±3.7%*
2 meses	92.3±1.9%	84.8±3.7%*
3 meses	96.5±2.1%	95.7±2.3%
4 meses	99.1±0.7%	98.8±1.1%

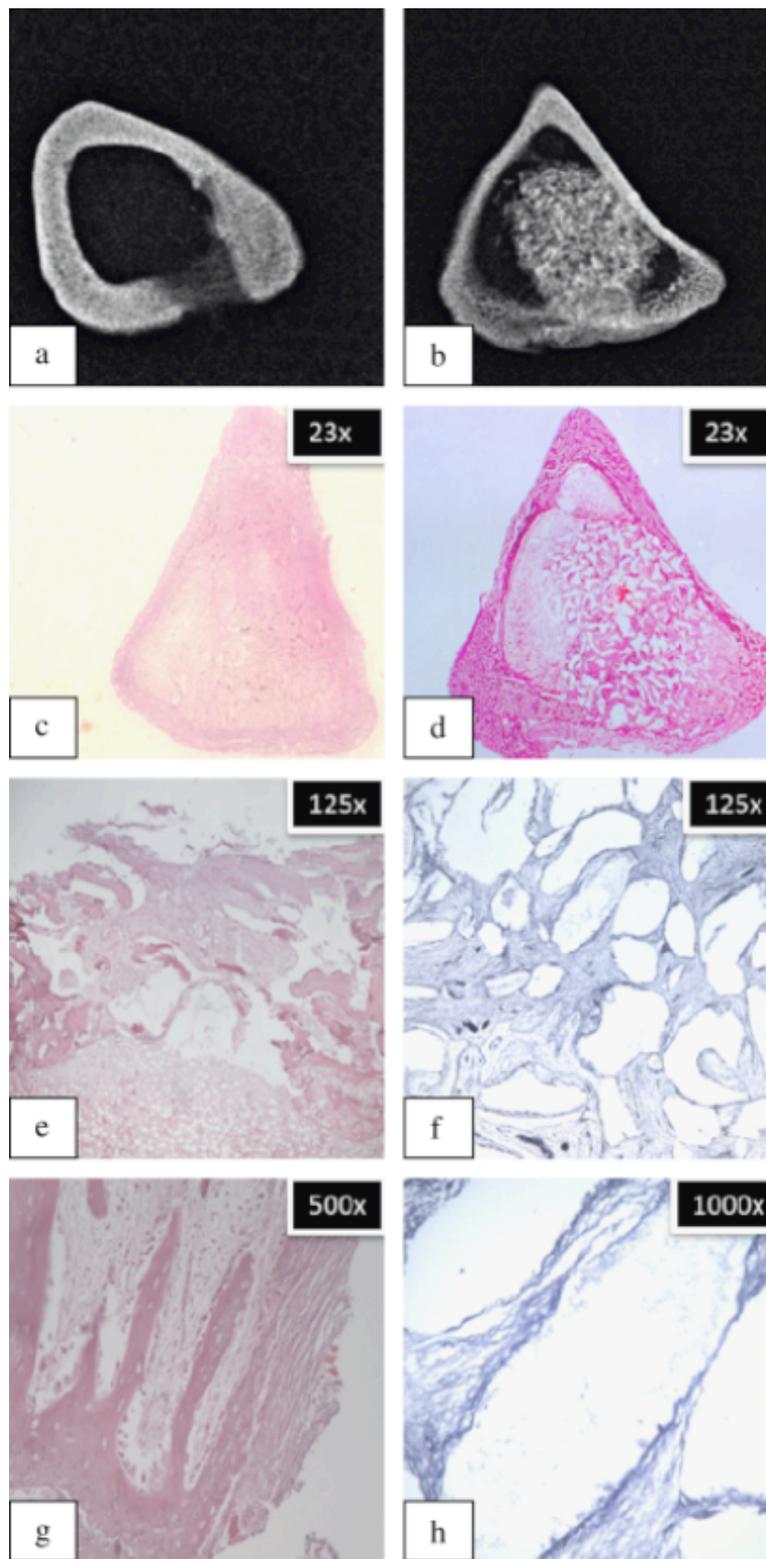


FIGURA 3

2 Meses: (a) Sección transversal radiográfica (control). (b) Sección transversal radiográfica Endobon®, (c) Imagen panorámica 23X, TM control. (d) Imagen panorámica 23X, TM Endobon®, (e) Detalle 125X, TM control. (f) Detalle 250 X, TM Endobon®, (g) MAyor aumento 500X, TM control, (h) Mayor aumento 500X, TM Endobon®. HE: Hematoxilina-Eosina, TM: Tricrómico de Masson

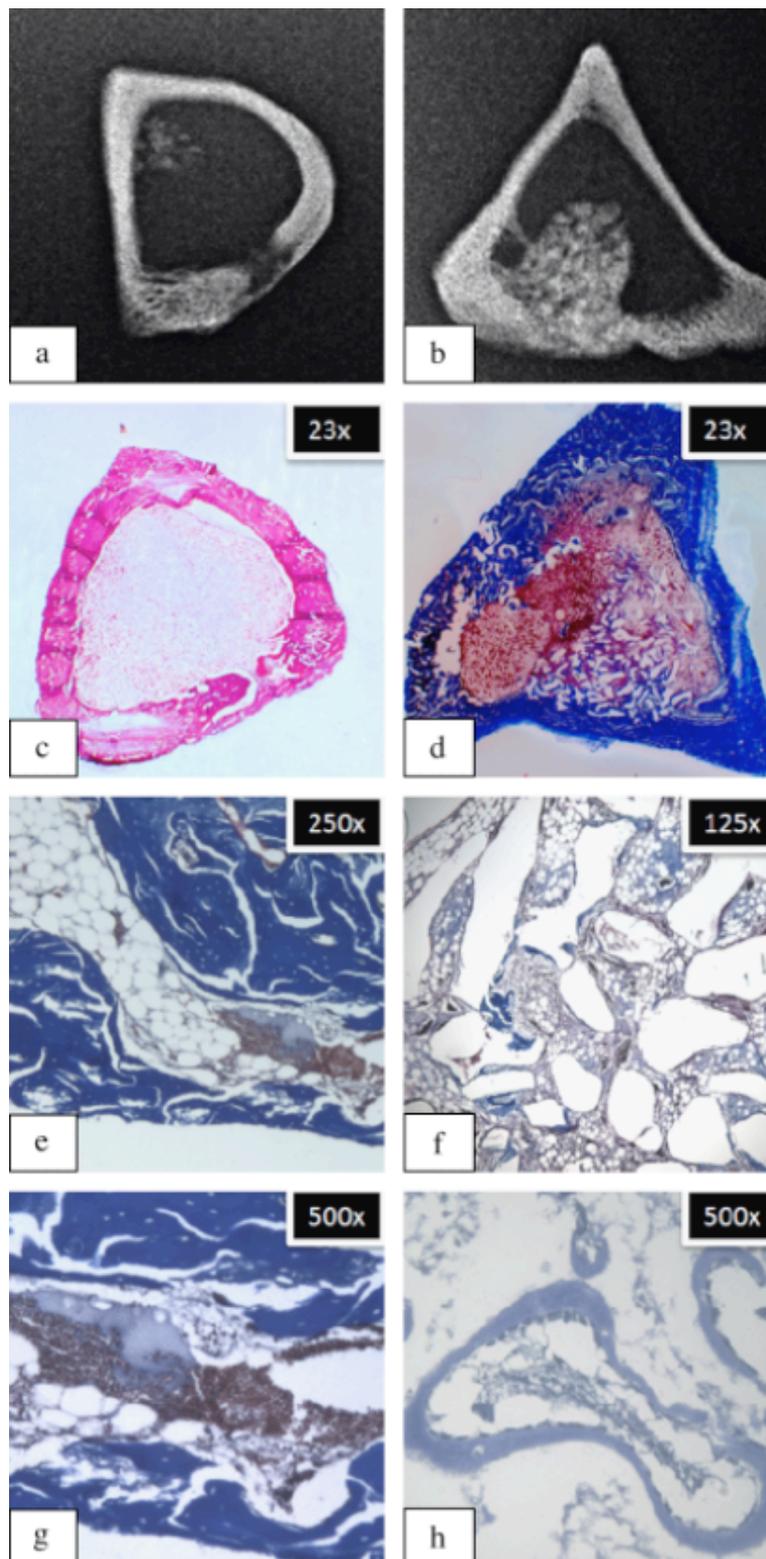


FIGURA 4

3 Meses: (a) sección transversal radiográfica (control). (b) Sección transversal radiográfica Endobon® (c) Imagen panorámica 23X, HE control. (d) Imagen panorámica 23X, TM Endobon®. (e) Detalle 250X, TM control. (f) Detalle 125X, TM Endobon®. (g) Mayor aumento 500X, TM control. (h) Mayor aumento 500X, TM Endobon®. HE: Hematoxilina-Eosina TM: Tricrómico de Masson.

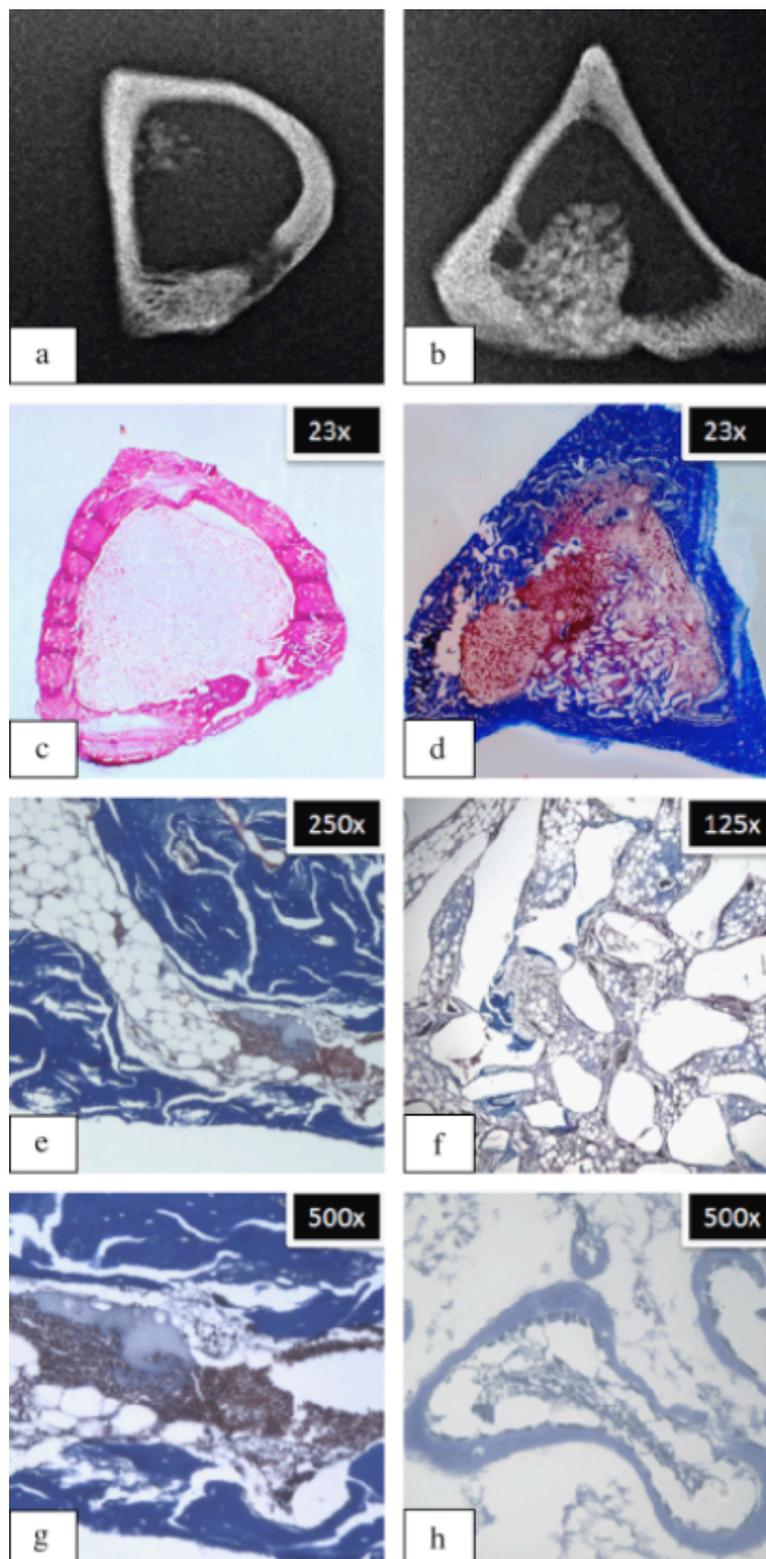


FIGURA 5

4 Meses: (a) Sección transversal radiográfica (control). (b) Sección transversal radiográfica Endobon®, (c) Imagen panorámica 23X, HE control. (d) Imagen panorámica 23X, HE Endobon®, (e) Detalle 125X, TM control, (f) Detalle 125X, TM Endobon®, (g) Mayor aumento 250X, TM control, (h) Mayor aumento 500X, TM Endobon®. HE: Hematoxilina-Eosina TM: Tricrómico de Masson.

DISCUSIÓN

Los injertos de hueso autólogo continúan siendo la mejor opción debido a que contienen células viables, incluyen médula ósea, células osteoprogenitoras, matriz extracelular con colágeno y sin colágeno así como factores de crecimiento y diferenciación celular (33).

Sin embargo muchos clínicos buscan alternativas (33) para evitar así, zonas quirúrgicas secundarias (sitios donantes) (9), y condiciones indeseables del post-operatorio (33-36), además de reducir los tiempos quirúrgicos. Aunque algunos estudios de injertos de hueso cortico-esponjoso autólogo mostraron baja morbilidad y un dolor ligero a moderado al tercer día de la cirugía (16). Desde hace algunos años el hueso cortico-esponjoso bovino ha sido la principal elección en cirugía bucal y maxilofacial. Con numerosos estudios que han comprobado la efectividad de xenoinjertos fabricados con hueso bovino (15,36-38), una posible complicación derivada de su uso podría ser la transmisión de virus (39-40).

El material utilizado en este estudio Endobon® RegenerOss t (BIOMET3i) es una hidroxiapatita cerámica derivada de hueso esponjoso completamente deproteinizado por un proceso de fabricación a altas temperaturas de dos pasos, que elimina riesgo de bacterias, virus y priones. El primer paso de este proceso es la pirólisis a una temperatura >900°C, que elimina los elementos orgánicos, y un segundo paso que es un proceso de ceramización a una temperatura >1200°C que crea una estructura cristalina. Este proceso asegura la ausencia de reacciones inmunes y garantiza la bicompatibilidad (28).

El material Endobon® está disponible en forma de bloques, cilindros y gránulos de diferentes tamaños. La forma elegida para este trabajo fue en gránulos de entre 500-1000 µm, con una porosidad mayor al 50%. Gracias a esta estructura y características, el biomaterial es excepcionalmente maleable y plástico, lo que facilita su aplicación y su baja radioopacidad. Tiene una estructura similar a la del hueso con interconexiones entre los poros generada por el tratamiento calórico que recibe (30,40). La composición del hueso de origen animal es morfológicamente similar a la del hueso humano mas que cualquier producto sintético, y el análisis de los resultados clínicos de los diferentes productos desarrollados por la industria biomédica muestran una superioridad general de sustitutos óseos de origen animal que otros sustitutos (30).

El actual trabajo ha confirmado la biocompatibilidad del Endobon®, dada la mínima respuesta inflamatoria observada en los estadios iniciales del estudio y que esta tuvo poca relevancia clínica (30). A 1 mes esta fue apreciable por el bajo número de linfocitos y macrófagos sin formación de tejido de granulación. No se observó ningún tipo de fibrosis en los límites entre el injerto y el hueso adyacente. Esto reforzado por el hecho de la formación de hueso nuevo alrededor del material injertado, lo que confirma la capacidad de osteointegración del Endobon® (28,40).

Igualmente estudios previos han mostrado que posterior a una adecuada implantación el endobon se integra perfectamente y el hueso neoformado se deposita directamente sobre la estructura cerámica trabecular sin interfases de tejido fibroso (21). Nuestros resultados también comprobaron la capacidad osteoconductiva de este material (26), que actúa como un andamiaje para las células óseas (28).

Uno de los principales factores que influyen la osteoconducción es el tamaño del gránulo del biomaterial. Este estudio confirma los hallazgos de estudios previos que establecen una relación entre el tamaño del poro y la granulometría y la cantidad de tejido óseo neoformado

(20), concluyendo que el tamaño del poro y la granulometría no deberían ser demasiado reducidas dado que ambos influyen el tipo y cantidad de nuevo tejido óseo formado. En el mismo sentido otros estudios con hidroxiapatitas de diferente porosidad (25), han llegado a la conclusión de que las hidroxiapatitas de alta porosidad se osteointegran mejor en términos de nuevo hueso formado, comparadas con hidroxiapatitas no interconectadas por poros.

El presente estudio está en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (30), que confirman que la presencia de poros interconectados facilita el crecimiento óseo. La interconexión de micro y macro poros incrementa la vascularización y le confiere estabilidad al injerto.

Este material posee un sistema de poros interconectados similares a los del hueso esponjoso humano, que contribuye a promover el nivel de unión entre la hidroxiapatita y el hueso en crecimiento (41).

Las propiedades osteoconductoras del material permiten el crecimiento óseo (28). Este hecho se comprobó mediante microscopía óptica en este trabajo. El análisis radiográfico de los dos últimos períodos de tiempo 3 y 4 meses revelaron una disminución en el volumen total del material, lo que junto con los resultados histológicos indican un reemplazo del tejido osteoide por tejido adiposo y hematopoyético. Sin embargo esto demuestra una reabsorción incompleta del injerto, esta característica del hueso bovino ha sido descrita previamente (41); donde después de 18 meses no se apreciaron signos histológicos de reabsorción o degradación del material (21). A pesar de ser no reabsorbible como en otros estudios (40), nosotros observamos una disociación parcial de la superficie de la hidroxiapatita. De acuerdo a otros estudios (30), los métodos de fabricación del material, resultan en una estructura cristalina con un alto contenido en óxido de calcio, y esto podría promover la formación ósea en los defectos a diferencia de lo que sucede en los controles donde no se colocó ningún material (43)

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren:

1. Endobon® RegenerOss (BIOMET3i) es un material biocompatible, que causa mínima respuesta inflamatoria en los estadios iniciales, y no interfiere con el proceso normal de reparación ósea.
2. Endobon® RegenerOss (BIOMET3i) es un material osteoconductor que actúa como andamiaje para las células óseas y permitiendo el crecimiento de hueso en la periferia.
3. Endobon® RegenerOss (BIOMET3i) no es reabsorbible en el período de tiempo utilizado en este estudio.

RECOMENDACIONES

Este trabajo presenta una interesante línea de investigación, con un modelo animal sencillo y económico, para conocer los límites de aplicación de biomateriales sustitutos óseos. Los xenoinjertos de origen bovino han sido contrastados en cirugía oral y maxilofacial, sin embargo cada nuevo material requiere ser probado para conocer sus bondades y limitaciones. Aunque los datos de este trabajo no pueden ser extrapolados directamente al ser humano,

proporciona información valiosa sobre el comportamiento del biomaterial en defectos de 4mm de diámetro como podría ser el diámetro del alvéolo post extracción de una raíz en zona de premolares, o incisivos centrales superiores, dado los rangos de reabsorción de los xenoinjertos de origen bovino una posible aplicación podría ser en las técnicas de preservación del reborde alveolar.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Biomet. 3i, Ibérica, por el suministro del biomaterial empleado en este trabajo

Por el procesado de las muestras, al servicio de Anatomía Patológica de La facultad de Medicina de la Universidad de Murcia.

REFERENCIAS

1. McALLISTER B, HAGHIGHAT K. Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology* 2007; 78: 377–396.
2. ESPOSITO M, GRUSOVIN M, REES J, KARASOULOS D, FELICE P, ALISSA R, ET AL. Effectiveness of sinus lift procedures for dental implant rehabilitation: a Cochrane systematic review. *European Journal of Oral Implantology* 2010;3: 7–26.
3. ERSANLI S, OLGAC V, LEBLEBICIOGLU B. Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. *Journal of Periodontology* 2004;75: 750–756.
4. ESPOSITO M, GRUSOVIN M, COULTHARD P, WORTHINGTON H. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2006; 21: 696–710.
5. AGHALOO T, MOY P. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for the implant placement?. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2007 ;22 (Suppl. 1): 49–70.
6. SCHLEGEL K, FICHTNER G, SCHULTZE-MOSGAU S, WILTFANG J. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2003; 18: 53–58.
7. BARONE A, COVANI U. Maxillary alveolar ridge reconstruction with non-vascularized autogenous block bone: clinical results. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2007; 65: 2039–2046.
8. JOHANSSON L, ISAKSSON S, LINDH C, BECKTOR J, SENNERBY L. Maxillary sinus floor augmentation and simultaneous implant placement using locally harvested autogenous bone chips and bone debris: a prospective clinical study. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2010;68: 837–844.
9. NKENKE E, RADESPIEL-TRÖGER M, WILTFANG J. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clinical Oral Implants Research* 2002;13: 514–520.

10. CRICCHIO G, LUNDGREN S. Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 2003; 5: 161–169.
11. SASSO R, LEHUEC J, SHAFFREY C. Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *Journal of Spinal Disorders and Techniques* 2005;18: 77–89.
12. ARCURI C, CECCHETTI F, GERMANO F, MOTTA A, SANTACROCE C. Clinical and histological study of a xenogenic bone substitute used as a filler in postextractive alveolus. *Minerva Stomatologica* 2005; 54:351–362.
13. PIATELLI M, FAVERO G, SCARANO A, ORSINI G, PIATELLI A. Bone reactions to anorganic bovine bone used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1999; 14: 835–840.
14. NORTON M, ODELL E, THOMPSON I, COOK R. Efficacy of bovine mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clinical Oral Implants Research* 2003; 14: 775–783.
15. WORTH A, MUCALO M, HOME G, BRUCE, W, BURBIDGE H. The evaluation of processed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. *Clinical Oral Implants Research* 2005; 16: 379–386.
16. BARONE A, CRESPI R, ALDINI N, FINI M, GIARDINO R, COVANI U. Maxillary sinus augmentation: histologic and histomorphometric analysis. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 2005; 20: 519–525.
17. ORSINI G, SCARANO A, PIATELLI M, PICCIRILLI M, CAPUTI S, PIATELLI A. Histologic and ultrastructural analysis of the regenerated bone in maxillary sinus augmentation using a porcine bone derived biomaterial. *Journal of Periodontology* 2006; 77: 1984–1990.
18. NANNMARK U, SENNERBY L. The bone tissue responses to prehydrated and collagenated corticocancellous porcine bone grafts: a study in rabbit maxillary defects. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 2008;10: 264–270.
19. DI STEFANO D, ARTESE L, LEZZI G, PIATELLI A, PAGNUTTI S, PICCIRILLI M, ET AL. Alveolar ridge regeneration with equine spongy bone: a clinical, histological, and immunohistochemical case series. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2009;11: 90–100.
20. HING K, BEST S, TANNER K, BONFIELD W, REVELL P. Biomechanical assessment of bone ingrowth in porous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1997;8: 731–736.
21. BRIEM D, LINHART W, LEHMANN W, MEENEN N, RUEGER, J. Long-term outcomes after using porous hydroxyapatite ceramics (Endobon®) for surgical management of fractures of the head of the tibia. *Der Unfallchirurg* 2002;105: 128–133.

22. KEHR P, GOSSET F. Endobons as a bone substitute in spine surgery. Preliminary study in 11 patients. *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology* 2000;10: 217–221.
23. WERBER K, BRAUER R, WEISS W, BECKER K. Osseous integration of bovine hydroxyapatite ceramic in metaphyseal bone defects of the distal radius. *Journal of Hand Surgery* 2000; 25: 833–841.
24. GRIMM J, MUELLER-HUELSBECK S, MUELLER M, EGBERS H, BRINKMANN G, HELLER, M. Evaluation of hydroxyapatite implants in vertebral bodies and extremities by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 2001;121: 158–161.
25. MOTOMIYA M, ITO M, TAKAHATA K, IRIE K, ABUMI K, MINAMI A. Effect of hydroxylapatite porous characteristics on healing outcomes in rabbit posterolateral spinal fusion model. *European Spine Journal* 2007;16: 2215–2224.
26. WILTFANG J, MERTEN H, WILTFANG J. Ectopic bone formation with the help of growth factor bFGF. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 1996; 24: 300–304.
27. HING K, BEST S, TANNER K, BONFIELD W, REVELL P. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 2004;68: 187–200.
28. GIERSE H, DONATH K. Reactions and complications after the implantation of Endobon including morphological examination of explants. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 1999;119: 349–355.
29. BAER W, SCHALLER P, CARL H. Spongy hydroxyapatite in hand-surgery: a five year follow-up. *Journal of Hand Surgery Br.* 2002;27:101–3
30. TAMAI N, MYOUI A, TOMITA T, NAKASE T, TAKANA J, OCHI T, YOSHIKAWA H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; 59: 110–117.
31. TADIC D, EPPLE M. A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 2004; 25: 987–994.
32. YAMAMICHI N, ITOSE T, NEIVA R, WANG H. Long-term evaluation of implant survival in augmented sinuses: a case series. *The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 2008; 28: 163–169.
33. CUTTER C, MEHRARA B. Bone grafts and substitutes. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 2006; 16: 607–618.
34. VAN STEENBERGHE D, CALLENS A, GEERS L, JACOBS R. The clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation. *Clinical Oral Implants Research* 2000; 11: 210–216.

35. HISING P, BOLIN A, BRANTING C. Reconstruction of severely resorbed alveolar ridge crests with dental implants using a bovine bone mineral for augmentation. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2001; 16: 90–97.
36. LANG N, HÄMMERLE C, OESCH B, SCHENK R. Risk of transmission of agents associated with Creutzfeldt–Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2000;105: 2273–2275.
37. WENZ B, OESCH B, HORTS M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001; 22: 1599–1606.
38. LIEBENDÖRFER A, TRÖSTER S. Hydroxyapatite ceramics in clinical application. Histological findings in 23 patients. *Unfallchirurgie* 1997;23: 60–68.
39. SANTOS F, POCHASPSKI M, MARTINS M, ZENOBIO E, SPOLIDORO L, MARCANTONIO E. Comparison of biomaterial implants in the dental socket: histological analysis in dogs. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 2010; 12: 18–25.
40. KHODADADYAN–KLOSTERMANN C, LIEBI T, MELCHER I, RASCHKE M, HAAS N. Osseous integration of hydroxyapatite grafts in metaphyseal bone defects of the proximal tibia (CT–study). *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca* 2002;69: 16–21.
41. SCHNETTLER R, DINGELDEIN E, HERR G. Defect reconstruction using demineralized bone matrix. Experimental studies on piglets. *Orthopadie* 1998; 27: 80–88.
42. JENSEN S, AABOE M, PINHOLT E, HJØRTING–HANSEN E, MELSEN F, RUYTER I. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1996;11: 55–66.
43. LILJENSTEN E, ADOLFSSON E, STRID K, THOMSEN P. Resorbable and non–resorbable hydroxyapatite granules as bone graft substitutes in rabbit cortical defects. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 2003;5: 95–101.