

***INFLUENCIA DEL PLASMA RICO EN
PLAQUETAS EN LA REGENERACIÓN
ÓSEA: ESTUDIO DENSITOMÉTRICO Y
MORFOMÉTRICO EN CALOTA DE
CONEJAS OSTEOPORÓTICAS***

TESIS DOCTORAL

2006

Jesús Torres García-Denche

Directores

Prof. I. Fdez-Tresguerres Hdez-Gil

Prof. L. Blanco Jerez

A mi esposa Raquel

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas, sin las cuales no habría sido capaz de llevar a cabo esta tesis doctoral:

Al Profesor Luis Blanco Jerez por la dirección de esta tesis, señalando su constante estímulo en el campo de la investigación, su entusiasmo por este trabajo y el afecto que siempre me ha mostrado. He tenido la suerte de encontrar en él a un maestro.

A la Profesora Isabel Fdez-Tresguerres por la dirección de esta tesis; me ha transmitido su ilusión por la investigación y me ha ayudado con su inagotable capacidad de trabajo. Mi especial reconocimiento a su dedicación.

A la Profesora Celia Clemente por sus enseñanzas sobre histomorfometría y su ayuda en la interpretación histológica.

A Maite por su colaboración en el procesamiento de las muestras histológicas y en el análisis estadístico.

A Pedro Cordente por su apoyo incondicional y por su colaboración desinteresada en las intervenciones quirúrgicas.

A todos mis compañeros del Departamento de Ciencias de la Salud III de la U.R.J.C.

ÍNDICE

1. Antecedentes y Justificación	5
2. Hipótesis de Trabajo y Objetivos	10
3. Introducción	13
3.1 Tejido Óseo	14
3.1.1. Estructura	15
3.1.1.1. Células	17
3.1.1.2. Matriz Orgánica	20
3.1.1.3. Fase Mineral	25
3.1.2. Fisiología	27
3.1.2.1. Remodelado óseo	28
3.1.3. Osteoporosis	48
3.1.3.1. Osteoporosis idiopática o primaria	50
3.1.3.2. Osteoporosis secundaria	51
3.1.3.3. Factores de riesgo	53
3.1.3.4. Afectación mandibular en la osteoporosis	58
3.1.3.5. Osteoporosis experimental	61
3.1.3.6. Fármacos empleados en el tratamiento de la osteoporosis	64
3.2. Regeneración Ósea	66
3.2.1. Terapéuticas de regeneración ósea	68
3.2.2. Factores de crecimiento	80
3.2.3. Plasma Rico en Plaquetas (PRP)	102

4. Material y Metodología	105
4.1. Material	106
4.1.1. Animales de experimentación	107
4.1.2. Preparación del modelo de osteoporosis experimental	107
4.1.3. Material de experimentación	108
4.1.4. Material farmacológico	108
4.1.5. Material para obtención del PRP	108
4.1.6. Material densitométrico	109
4.1.7. Material histológico	109
4.2. Metodología	110
4.2.1. Método de obtención del PRP	112
4.2.2. Fase experimental	113
4.2.3. Estudio histológico	114
4.2.4. Valoración morfológica	116
4.2.5. Valoración densitométrica	116
4.2.6. Tratamiento estadístico de los resultados	117
5. Resultados	122
5.1. Estudio histológico. Morfometría	123
5.2. Estudio densitométrico	132
6. Discusión	133
7. Conclusiones	171
8. Bibliografía	173

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El tratamiento con implantes osteointegrados constituye una de las alternativas más predecibles para la sustitución de dientes perdidos, cumpliendo en muchos casos las expectativas funcionales (estéticas, masticatorias y fonatorias) de los pacientes. A pesar de la evolución de las técnicas quirúrgicas, la aparición de nuevas superficies de implantes y los avances en el campo de los biomateriales, se observa en la mayoría de las estadísticas actuales, un índice de fracasos entre un 5% y un 10 % a los cinco años (1-4).

El éxito de la osteointegración depende en parte de la cantidad y calidad del sustrato óseo remanente así como de su capacidad de regeneración. Sin embargo estas variables podrían estar alteradas en pacientes osteoporóticos. La osteoporosis es la alteración metabólica ósea más frecuente y uno de los mayores problemas de salud pública en el momento actual en todo el mundo. Se define como una enfermedad sistémica esquelética caracterizada por una densidad mineral ósea baja y un deterioro microestructural del hueso, con un aumento consiguiente de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad a las fracturas (5). La prevalencia de la osteoporosis ha alcanzado actualmente proporciones epidémicas pues afecta aproximadamente al 30% de las mujeres postmenopáusicas y a casi el 50% de las mayores de 75 años, datos que la han hecho merecedora del término “epidemia silente” (6).

La relación directa entre la osteoporosis y la pérdida de hueso a nivel de los maxilares, ha suscitado frecuentes controversias, pero al igual que los efectos de la osteoporosis se observan típicamente en las vértebras y en los huesos largos, también podría producirse en otros huesos de la economía, incluyendo los huesos maxilares (7). Debido a la creciente demanda de tratamientos implantológicos en pacientes de edad avanzada, la posible afectación de los huesos maxilares tiene especial importancia, ya que esta alteración en el metabolismo óseo podría modificar la capacidad de formación de hueso alrededor de los implantes y la afectación de los maxilares supondría un importante factor de riesgo para el éxito de la osteointegración (8), unido al problema que supone el déficit óseo, tan frecuente en ancianos.

No obstante, en la actualidad no existe evidencia científica que contraindique la colocación de implantes osteointegrados en individuos osteoporóticos (8,9).

El tratamiento con implantes osteointegrados en pacientes con osteoporosis, ha despertado el interés de la comunidad científica y se han desarrollado diferentes modelos animales, en los que se induce la aparición de osteoporosis, especialmente mediante ovariectomía y dieta hipocálcica (10,11), para estudiar la respuesta del hueso osteoporótico frente a los implantes osteointegrados y diversos biomateriales.

La insuficiente disponibilidad ósea para la estabilización de los implantes es una de las circunstancias más frecuentes en la práctica implantológica. Por ello, el aumento del sustrato óseo mediante técnicas regenerativas, constituye una de las líneas de investigación más importantes en la actualidad. Así, los injertos óseos autógenos, en bloque o particulados, sustitutos óseos, biomateriales, membranas y factores de crecimiento suelen emplearse de forma aislada o combinada para incrementar la cantidad de hueso remanente de forma previa o simultáneamente a la colocación de los implantes osteointegrados (12,13,14,15).

Sin embargo la capacidad de conseguir regeneración ósea es limitada y es ahora, con un mayor conocimiento acerca de los factores de crecimiento, cuando empiezan a aparecer estudios esperanzadores en el campo de la regeneración ósea, basados en promover la diferenciación, migración y proliferación de las células involucradas en la regeneración ósea. Existen en la actualidad muchas líneas de investigación, que incluyen desde la utilización de factores de crecimiento como PDGF, IGF y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) en estudios de regeneración ósea, hasta la aplicación de hormona de crecimiento (GH) (11).

En 1994, Tayapongsak y cols (16) introdujeron la novedosa idea de la aplicación de un coágulo de fibrina en la reconstrucción de defectos mandibulares junto con injerto óseo autógeno, identificando radiográficamente consolidaciones óseas tempranas en 33 casos, atribuyendo a la red de fibrina un incremento de la osteoconducción sobre las células osteocompetentes del injerto. También refieren su utilización como vehículo para la compactación de injertos, aunque ya se utilizara de manera rutinaria para este fin en traumatología durante las últimas décadas (17).

El descubrimiento de factores de crecimiento en el adhesivo de fibrina autólogo (AFA), despertó el interés de los investigadores, en el sentido de utilizar este producto no sólo como agente osteoconductor y vehiculizador de injertos, sino como posible agente osteoinductor (18,19).

En 1995, Slater y cols, en un trabajo *in vitro*, obtuvieron un aumento en la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos y un incremento en la síntesis de matriz extracelular cuando se cultivan dichos osteoblastos en presencia de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (20).

En 1997, Whitman observó las diferencias entre el AFA y el plasma rico en plaquetas (PRP) y propuso algunas posibles aplicaciones del PRP en cirugía bucal y maxilofacial, como reconstrucciones mandibulares, procedimientos de elevación de seno, fisuras palatinas y procedimientos relacionados con la colocación de implantes (21).

En 1998, Marx y cols aplicaron sus estudios sobre PRP, y observaron la existencia de un incremento del número de plaquetas en este concentrado de un 338% con respecto a los niveles basales plaquetarios, mostrando la presencia de al menos tres factores de crecimiento PDGF, TGF- β 1 y β 2, y refiriendo la existencia de receptores en el hueso trabecular para dichos factores de crecimiento (22). La utilización de este preparado junto con injerto óseo autógeno en reconstrucciones mandibulares demostró que producía una aceleración y aumento en la densidad del hueso formado a los 6 meses respecto del grupo control, valorado mediante radiografías panorámicas. La activación del PRP la realizaban mediante la adición al preparado de trombina bovina (22).

En 1999, Anitua refirió la utilización del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en pacientes que presentaban enfermedad periodontal, susceptibles de tratamiento implantológico y en pacientes con fracturas verticales en dientes que se sustuirían mediante implantes unitarios, con resultados significativamente mejores, desde el punto de vista de la regeneración y maduración ósea con respecto al grupo control y exento de riesgos para el paciente (23).

El uso de factores de crecimiento con efectos estimulantes en la migración, diferenciación y proliferación celular, se ha propuesto tanto para regeneración ósea, como periodontal (24,25).

A la vista de esta situación, creemos que el estudio de la influencia de la asociación de biomateriales osteoconductores y plasma rico en plaquetas (PRP) en la regeneración ósea en un hueso osteoporótico, justifica la realización de este trabajo como Tesis Doctoral.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El procedimiento de la colocación de implantes implica la realización de un trauma óseo que tenderá a cicatrizar de forma natural hasta conseguir la *restitutio ad integrum* mediante deposición de hueso nuevo. Tras el traumatismo se produce inmediatamente una hemorragia local seguida de la formación y organización de un coágulo sanguíneo. En estas zonas donde se produce una disrupción vascular las plaquetas se agregan y se activan de forma natural liberando el contenido de sus gránulos. De esta forma se liberan una serie de factores de crecimiento que ponen en marcha el comienzo de la revascularización y migración de células osteocompetentes.

El objetivo de los tratamientos con PRP es aumentar el número de plaquetas que de forma natural están presentes en los procesos regenerativos y por tanto aumentar los factores de crecimiento que contienen.

Recientemente se ha observado que el uso de PRP en el campo de la cirugía maxilofacial favorece la formación ósea y mejora la regeneración cuando se mezcla con hueso autógeno y con diferentes sustitutos óseos (22).

Nuestro trabajo analizará la regeneración ósea del hueso osteoporótico, en un modelo experimental mediante la asociación de PRP y un material osteoconductor. Siendo nuestra hipótesis de trabajo que: “La administración de PRP asociado a una hidroxiapatita bovina, en un modelo experimental osteoporótico, produce mayor regeneración ósea que la administración de cualquiera de ambos materiales por separado.”

Para corroborar esta hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Valorar mediante estudio densitométrico, la densidad del hueso neoformado con la administración de PRP, hidroxiapatita bovina o la asociación de ambos materiales, en defectos experimentales creados en la calota de conejas osteoporóticas.
- 2) Cuantificar mediante estudio morfométrico la regeneración ósea obtenida con la administración de PRP, hidroxiapatita bovina o la asociación de ambos materiales, en defectos experimentales creados en la calota conejas osteoporóticas.
- 3) Cuantificar mediante estudio histomorfométrico el porcentaje de hidroxiapatita bovina remanente tanto de forma aislada como en combinación con PRP, en defectos experimentales creados en la calota de conejas osteoporóticas.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Tejido óseo

3.1.1. Estructura

La organización de los huesos, desde su forma macroscópica a su estructura microscópica, asegura la máxima resistencia con la mayor economía de material y el peso mínimo. A pesar de su fuerza y su dureza, el hueso es un material vivo y dinámico, que se renueva continuamente y que experimenta un permanente remodelado durante la vida del individuo. A causa de esta reconstrucción interna continua y de su capacidad de responder a estímulos mecánicos puede ser modificado por medio de procedimientos quirúrgicos y prótesis ortopédicas. El hueso responde también de modo sorprendente a las influencias metabólicas, nutritivas y endocrinas.

Desde el punto de vista morfológico se pueden considerar dos tipos de hueso: el cortical o compacto y el esponjoso o trabecular. Ambos están formados por laminillas de tejido mineralizado que forman osteonas. El hueso trabecular está constituido por laminillas óseas que forman un retículo tridimensional de espículas óseas ramificadas o trabéculas que delimitan un sistema laberíntico de espacios intercomunicados, ocupados por la médula ósea. Las laminillas del hueso compacto se disponen concéntricamente en torno a un canal vascular del interior del hueso, para formar unas unidades estructurales cilíndricas llamadas sistemas haversianos u osteonas, dando el aspecto de una masa sólida continua. (26).

Con pocas excepciones, los huesos están recubiertos por el periostio, que es una capa de tejido conjuntivo especializado, dotada de potencia osteogénica, es decir que tiene la capacidad de formar hueso. El revestimiento perióstico está ausente en aquellas áreas de los extremos de los huesos largos que están cubiertas por cartílago articular y en las zonas donde los ligamentos y los tendones se insertan en el hueso. En las áreas donde falta el periostio, el tejido conjuntivo en contacto con la superficie del hueso carece de actividad osteogénica y no contribuye, por tanto, a la curación de las fracturas. La cavidad medular de la diáfisis y las cavidades del hueso esponjoso están revestidas por el endostio, que es una fina capa celular que también posee capacidad osteogénica.

Sin embargo, tanto el hueso compacto como el trabecular están constituidos por células, matriz orgánica y sustancia mineral.

3.1.1.1. Células

En el tejido óseo se distinguen cuatro tipos de células óseas: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Aunque los tres primeros se consideran como tipos celulares distintos, hay pruebas convincentes de que uno puede transformarse en otro y es por lo tanto más razonable considerarlos como estadios funcionales diversos de un mismo tipo celular. Los osteoclastos tienen un origen diferente: provienen de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea (27). En el tejido óseo también se distinguen monocitos, linfocitos, macrófagos, adipocitos y células endoteliales.

Al igual que otros tejidos conjuntivos, el hueso se origina a partir de células mesenquimales embrionarias, procedentes de la médula ósea. Estas **células osteoprogenitoras** persisten hasta la vida postnatal y se encuentran en todas o casi todas las superficies libres de los huesos. Las células osteoprogenitoras son más activas durante la fase de crecimiento de los huesos, aunque también se reactivan durante la vida adulta en las situaciones en las que se inicia la reparación de fracturas óseas y otras formas de lesión del hueso (27).

Se sabe desde los trabajos de Friederich y Owen que de las células mesenquimales embrionarias de la médula ósea pueden originarse 5 estirpes celulares diferentes: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipoblastos y mioblastos (28).

Los **osteoblastos** son las células osteoformadoras de los huesos maduros y en fase de desarrollo. Son células grandes de unas 40 μ de diámetro de forma poliédrica, con un gran retículo endoplasmático rugoso, que sintetizan y segregan la matriz orgánica. La mineralización se inicia poco después de la formación de la matriz. Además de secretar diversos componentes de la matriz como colágeno tipo I, proteoglicanos, osteocalcina, fosfatasa alcalina, osteonectina y osteopontina, los osteoblastos también pueden producir factores de crecimiento que dan lugar a importantes efectos autocrinos y paracrinos sobre el crecimiento óseo (29). A través de la síntesis de citoquinas específicas median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos (RANK-L) y en la hematopoyesis (Factor Estimulante del Crecimiento de colonias de Granulocitos y Macrófagos [GM-CSF] y de Macrófagos [M-CSF]) (30). La

mineralización se produce a través de la formación de unas pequeñas vesículas, con fosfatasa alcalina en su interior, que van a iniciar el proceso de cristalización del calcio y fósforo. Estas fosfatasas alcalinas producidas por los osteoblastos, escinden el pirofosfato inorgánico, que es un potente inhibidor de la mineralización, liberando fosfato (29,31).

La vida media de los osteoblastos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células de revestimiento (*lining cells*) o quedar gradualmente envueltas por la propia matriz y convertirse en **osteocitos** (un 15%). Estas son las células principales del hueso, ya que son las más abundantes (10 veces más que los osteoblastos). Residen en las lagunas osteoplasmáticas situadas en el interior de la sustancia intersticial calcificada y su cuerpo celular se adapta a la forma lenticular de la cavidad que ocupa, pero emiten numerosas prolongaciones delgadas que caminan por los conductos calcóforos que se extienden por los canalículos de la matriz, de forma que no están aislados en sus lagunas, sino que están comunicados unos con otros y, en último término, con las células situadas más superficialmente (osteoblastos y células de revestimiento). Esto puede explicar cómo las células situadas profundamente en la matriz calcificada del hueso pueden responder a estímulos hormonales que, en apariencia, sólo tendrían acceso directo a las células que están en la vecindad inmediata de los vasos sanguíneos. Igualmente los osteocitos son capaces de activarse y controlar el remodelado óseo detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción. De este modo forman una compleja red celular (sincitio) cuya función principal es la de participar en el remodelado óseo y en la maduración y remodelación de la matriz (32,33).

El hueso sufre durante toda su vida un proceso interno de remodelación y renovación a través del cual se elimina la matriz ósea en múltiples puntos y es sustituida por hueso neoformado. Las células que llevan a cabo la reabsorción ósea son los **osteoclastos**, procedentes de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM). Los osteoclastos alcanzan hasta 150 μm de diámetro y pueden presentar hasta 50 núcleos, con un “borde en cepillo”, que es donde tiene lugar la reabsorción. Estas células ocupan unas cavidades superficiales denominadas lagunas de Howship, que se deben a la acción

erosiva del osteoclasto sobre el hueso subyacente. Para realizar su función, los osteoclastos reciben unas señales químicas determinadas que son secretadas en un primer momento por los osteoblastos y que se denominan Factor Estimulante de las Colonias de Macrófagos (M-CSF). Este estímulo moviliza a los osteoclastos a la zona a reabsorber y se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el “ribete en cepillo” mediante integrinas, que son proteínas transmembrana que reconocen las proteínas de anclaje presentes en la matriz osteoide concretamente la secuencia Arg-Gly-Asp (o péptido RGD) (34,35). La reabsorción conlleva una primera fase de desmineralización, con una posterior degradación de la matriz ósea; mientras que inicialmente la producción de H⁺ provoca una desmineralización haciendo más soluble la fase mineral, la producción posterior de interleuquinas (IL-6), proteasas (colagenasas, proteoglicanasas, metaloproteasas y catepsina), así como de hidrolasas ácidas, facilita la degradación del colágeno óseo y completa la destrucción de hueso (36).

En la regulación de la osteoclastogénesis existen tres moléculas clave (30,37):

- 1.-OPG (Osteoprotegerina), proteína sintetizada por osteoblastos.
- 2.-RANK-L, ligando situado en la superficie de osteoblastos
- 3.-RANK, receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos

La interacción entre RANK-L y RANK produce una activación de la diferenciación osteoclástica, efecto que es inhibido por mediación de la OPG, que al unirse a RANK-L inhibe la diferenciación osteoclástica. Se ha demostrado que la administración de RANK-L a ratones normales produce un aumento de la calcemia, debido a un aumento de la reabsorción ósea, mientras que la administración de OPG incrementa la densidad mineral ósea (35).

Los osteoclastos también presentan receptores para *calcitonina*, hormona que inhibe la reabsorción ósea, sin embargo, no presentan receptores para sustancias pro-reabsorción como la hormona *paratiroidea* (PTH), que sí están presentes en la superficie de los osteoblastos.

Actualmente se sabe que una gran variedad de citoquinas (interleuquinas) y prostaglandinas intervienen en la regulación y activación de los osteoclastos estimulando la reabsorción ósea. Por el contrario, el interferón gamma, el factor beta transformador del crecimiento (TGF- β) y el antagonista del receptor de la interleuquina-1 inhiben la actividad osteoclástica (38,39). Los **macrófagos** y **linfocitos** en las áreas de reabsorción liberan Interleuquinas (IL-1, IL-6, IL-11), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF) favoreciendo la reabsorción (40).

3.1.1.2. *Matriz orgánica*

La matriz orgánica o **sustancia osteoide** fue descrita por Virchow en 1853 y representa el 35% del peso óseo deshidratado. Está formada en un 90% por colágeno tipo I incluido en una sustancia fundamental rica en proteoglicanos. El resto de la matriz orgánica contiene proteínas derivadas del suero (albúmina y alfa2-HS glucoproteínas), proteínas con ácido alfa-carboxiglutámico, glicoproteínas y factores de crecimiento (tabla I). Esta matriz constituye el molde para la sedimentación de los cristales de fosfato cálcico.

COLÁGENO	90%
PROTEOGLICANOS	1%
PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ CARBOXIGLUTÁMICO	1,7%
GLICOPROTEÍNAS	3,7%
ALBÚMINA	0,3%

Tabla I. Proteínas de la matriz osteoide

Actualmente se sabe que las propias proteínas de la matriz extracelular modulan la mineralización y la unión de las células a la matriz, jugando un papel importante en las interacciones de la matriz extracelular. Esta unión de las células a la matriz se conoce como anclaje. La principal molécula de adhesión de la matriz extracelular es la fibronectina, pero también existen otras moléculas de unión como la vitronectina,

laminina, osteopontina, osteonectina y trombospodina (41,42). La matriz extracelular también proporciona señales reguladoras, ofreciendo una superficie de anclaje para factores como las BMPs y los factores de crecimiento (43).

El hueso contiene **colágeno I**, en mayor proporción, pero también colágeno tipo III, V y XII. El colágeno I se sintetiza por el osteoblasto en forma de un precursor, la molécula de procolágeno, que tiene unas secuencias adicionales en ambos extremos. Una vez secretada por los osteoblastos, estos péptidos terminales se separan de la molécula por acción de unas enzimas específicas dando lugar a la molécula de colágeno, que se ensamblará en fibrillas y fibras. Estos péptidos de las regiones carboxiterminal (PICP) y aminoterminal (PINP) pasan a la sangre y son considerados como marcadores de formación ósea (44). Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y por la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas, creando una verdadera red tanto para la deposición mineral como para el anclaje celular debido a que en su molécula se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas (45). El colágeno, no tiene sin embargo afinidad por el calcio, lo que hace suponer que son otras proteínas las que están implicadas en el depósito mineral.

El 10% de la matriz ósea está constituido por proteínas no colágenas (tabla II). Los **proteoglicanos** constituyen el grupo más numeroso de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño y están formadas por un núcleo proteico y largas cadenas de glicosaminoglicanos, que son disacáridos sulfatados, por lo que retienen moléculas de agua.

PROTEOGLICANOS	<ul style="list-style-type: none"> • CONDROITIN SULFATO • DECORINA • BIGLICANO • HIALURONANO
PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ -CARBOXIGLUTÁMICO	<ul style="list-style-type: none"> • OSTEOCALCINA • PROTEÍNA de la matriz con ácido γ carboxi-glutámico
GLICOPROTEÍNAS	<ul style="list-style-type: none"> • OSTEONECTINA • FOSFATASA ALCALINA • PROTEÍNAS CON RGD: <ul style="list-style-type: none"> FIBRONECTINA TROMBOSPONDINA OSTEOPONTINA VITRONECTINA SIALOPROTEÍNAS ÓSEAS
PROTEÍNAS DEL PLASMA	<ul style="list-style-type: none"> • ALBÚMINA • 2-HS-glicoproteína
FACTORES DE CRECIMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> • IGF-I y II • PDGF • TGFβ (BMPs) • FGF

Tabla II. Proteínas no colágenas de la matriz (Tresguerres) (28)

En la matriz osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos (45):

- *Condroitín-sulfato*: de molécula grande, existe en las etapas iniciales de la osteogénesis y ocupa el espacio que se transformará en hueso.

- *Decorina*: de molécula más pequeña, aparece en las fases siguientes de la formación ósea y tiene afinidad por el TGF- β .
- *Biglicano*: igual que el anterior, también por afinidad por el TGF- β .
- *Hialuronano*: a diferencia del resto no posee núcleo proteico y no es sulfatado. Sin embargo interviene en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea.

Las **proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico** son la osteocalcina y la proteína con ácido γ -carboxi-glutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis.

- La *Osteocalcina* es una proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiendo de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido γ -carboxi-glutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos. Sólo se halla en tejidos mineralizados (46) y su función es la de ligar calcio (47). Es una proteína específica del hueso pero se produce en etapas finales de la osteogénesis (45).
- La *Proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico* no es exclusiva de la matriz osteoide, ya que también se sintetiza en pulmón, corazón y cartílago. Contiene cinco restos de ácido γ -carboxiglutámico y su función está relacionada con la adhesión de las células a la matriz a través de la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp).

Las **glicoproteínas** son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp).

- La *Osteonectina* es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Se caracteriza por favorecer primero la adhesión y posteriormente la agregación celular. Se cree que interviene

como sistema de anclaje de las células óseas a la matriz osteoide. También se ha encontrado en plaquetas, epitelios y membranas basales. En el hueso es necesaria para la normal mineralización.

- La *Fosfatasa Alcalina* es una enzima que libera fosfato inorgánico, necesario para la mineralización, catalizando la hidrólisis de ésteres de fosfato a pH alcalino. En realidad son 5 isoenzimas específicas procedentes de la matriz osteoide, hígado, intestino, y paratiroides, entre otros tejidos.
- *Proteínas con el tripéptido RGD*: Fibronectina, Trombospondina, Osteopontina, Vitronectina y Sialoproteínas óseas. Son glicoproteínas con la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) específica para la unión a las integrinas, receptores de superficie de las células óseas que permiten la adhesión de las células a la matriz extracelular.
 - La *Fibronectina* es producida en cartílago, hueso y médula ósea y se cree que participa en la organización de la matriz osteoide al ser sintetizada por los osteoblastos.
 - La *Trombospondina* se halla en plaquetas y tejido óseo y sirve para facilitar la adhesión de las células a la matriz extracelular.
 - La *Osteopontina* existe en riñón, hueso, médula ósea y cerebro. Se une fuertemente a la HA, por poseer dos moléculas de Asp.
 - La *Vitronectina* es una proteína del hígado que además se sintetiza en hueso para servir como anclaje celular.
 - Entre las *sialoproteínas*, proteínas con ácido siálico análogas a la osteopontina, se encuentra la *Sialoproteína Ósea*, que se combina con la hidroxiapatita y permite el anclaje de las células óseas a la matriz y la *Glicoproteína ácida-75*, que se une a la superficie mineralizada e inhibe la reabsorción.

Las **proteínas procedentes del plasma**, se hallan en la matriz osteoide, pero en mayor proporción que en éste, tales como la Albúmina y la α_2 -SH-glicoproteína, probablemente relacionadas con la incorporación de calcio a la matriz y los **factores de crecimiento** son proteínas sintetizadas en el propio hueso o procedentes de fuera (hígado, plaquetas,...), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células, de forma autocrina o paracrina (48), que se considerarán con posterioridad.

3.1.1.3. Fase mineral

La síntesis ósea es un proceso organizado, mediante el cual se deposita fosfato cálcico, que se encuentra en el medio extracelular en forma de solución sobresaturada, sobre una malla de colágeno que sirve de molde, conocida como matriz orgánica u osteoide. La fase mineral se compone de calcio, fósforo y carbonato (10:6:1) en forma de pequeños cristales hexagonales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y en menor proporción, brushita. También contiene magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor, representando el 65% del peso de hueso deshidratado. Estos cristales de hidroxiapatita se depositan en lugares específicos de los orificios que aparecen tras la disposición particular de las moléculas de colágeno, adaptándose a la orientación de sus fibras y favorecidos por la actuación de diversas proteínas con capacidad adhesiva que favorecen la mineralización, principalmente las fosfatasas alcalinas, que, secretadas por los osteoblastos, son las que van a iniciar el proceso de cristalización del calcio y fósforo en la mineralización ósea. Los cristales de hidroxiapatita se depositan entre las fibrillas de colágeno mediante la acción de proteínas secretadas también por los osteoblastos (osteopontina, osteonectina y sialoproteína ósea), y que aceleran la cristalización del calcio y fósforo y su depósito sobre el tejido osteoide, ya que el colágeno no tiene afinidad ni por el calcio ni el fosfato. Por el contrario los proteoglicanos y el pirofosfato son potentes inhibidores de la mineralización. Los proteoglicanos crean espacios ausentes de osteoide, impidiendo el depósito del mineral (49). Las moléculas de pirofosfato se unen a la superficie de los fosfatos de calcio, dificultando la formación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita (50).

Aunque la primera fase de la mineralización que supone el 65% del proceso es dependiente de los osteoblastos, la segunda fase que representa el 35% es un proceso acelular que consiste en el crecimiento de los cristales durante meses (51).

3.1.2. Fisiología

El hueso, como los restantes tejidos conjuntivos, está formado por células, fibras y sustancia fundamental, pero a diferencia de los otros, sus componentes extracelulares están calcificados y le convierten en un material duro, firme e idealmente adecuado para su función de soporte y protección. Además de estas funciones mecánicas desempeña una función hematopoyética y metabólica importante, como depósito de calcio, que puede ser tomado o depositado a medida que lo exige la regulación homeostática de la concentración de calcio en la sangre y en otros líquidos del cuerpo. Asimismo, el hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse, capaz de formar un callo de fractura y conseguir la *restitutio ad integrum* tras el trauma.

3.1.2.1. Remodelado óseo

La adaptación del hueso a las cargas y el mantenimiento de la homeostasis fosfocálcica son las causas de que el hueso sufra un continuo proceso de remodelado, que es llevado a cabo por las células óseas. Este proceso motiva que parcelas de hueso viejo sean destruidas y reemplazadas por hueso nuevo formado, considerándose un balance entre la reabsorción y la formación óseas, para neutralizar el desgaste. El remodelado es el proceso que tiene lugar durante el crecimiento, dando origen a un cambio de tamaño y de forma del hueso. El remodelado difiere del denominado modelado o formación de hueso hasta su total desarrollo, en que éste es general y continuo y el remodelado es local y cíclico.

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en las Unidades Básicas Multicelulares (o *basic multicellular units*, BMU), formadas por un osteoclasto, un osteoblasto, un pre-osteoblasto y un macrófago. En el esqueleto humano hay 35 millones de BMU y cada año se activan entre 3 y 4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años. En dichas unidades se produce primero la activación de los osteoclastos en un lugar determinado del esqueleto, lo que da lugar a la destrucción de hueso, para a continuación y en el mismo lugar, activarse los osteoblastos, formando hueso nuevo (52).

Las fases del remodelado son: (Modificado de Compston, 2001) (53)

- Fase quiescente o de reposo
- Fase de activación
- Fase de reabsorción
- Fase de inversión
- Fase de formación
- Fase de mineralización

Desde la fase de reposo el remodelado comienza con la activación de los osteoclastos. El fenómeno inicial es el reclutamiento de los precursores de los mismos, que más tarde proliferan, se diferencian y se fusionan, para formar las grandes células multinucleadas que constituyen los osteoclastos maduros. Todo ello está dirigido por una serie de “señales”, entre las que destacan M-CSF, RANK y RANK-L, no muy bien conocidas, pero de las que sabemos que guardan relación con cambios en la situación endocrinológica general del individuo, cambios paracrinos en el ambiente en que se establece la unidad de remodelado, cambios locales en las fuerzas mecánicas y cambios locales en la matriz ósea surgidos como consecuencia del envejecimiento o tras un trauma (54).

Tras el fenómeno de reabsorción, tiene lugar la fase de inversión, durante la cual probablemente se establecen señales que reclutan osteoblastos. El fenómeno es conocido como “*acoplamiento*” o adecuación temporoespacial entre la acción de los osteoclastos y la de los osteoblastos. Estas señales no se han identificado aún, pero se piensa que pueden consistir en factores de crecimiento enterrados en la matriz ósea que son liberados desde ella cuando es destruida. Los más conocidos son el IGF-I y II, TGF- β y las BMPs (figura 1). También podría tratarse de otras proteínas de la matriz liberadas por acción de los osteoclastos (la osteocalcina, por ejemplo, tiene efectos quimiotácticos) (55,56).

En la fase de formación los factores de crecimiento actúan como quimiotácticos de los pre-osteoblastos estimulando además su proliferación y diferenciación. En esta fase los osteoblastos sintetizan matriz osteoide, cesando su actuación probablemente en

el momento en el que reciben una señal para ello. Algunos autores defienden que esa señal viene dictada por un “mecanostato”, que indica a las células cuánto hueso deben formar para que se ajuste a las sobrecargas mecánicas.

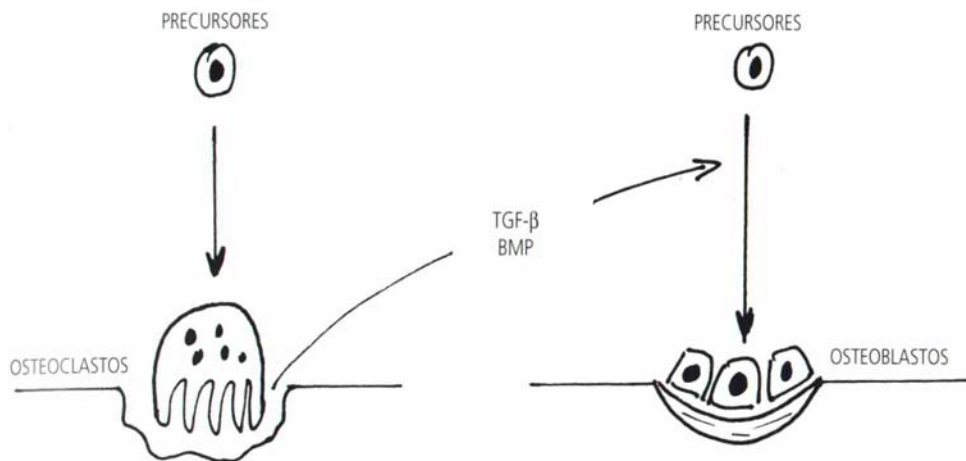


Fig 1. Acoplamiento entre osteoclastos y osteoblastos a través del TGF-beta y las BMP (proteínas morfogenéticas del hueso) liberadas por la reabsorción ósea.

A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a los 90 días en el hueso trabecular.

Las unidades de remodelado tienen una configuración espacial distinta en el hueso cortical que en el trabecular (figura 2). En el cortical los osteoclastos actúan labrando en la profundidad del tejido óseo una cavidad tuneliforme. En cambio, en el hueso trabecular actúan en la superficie de la trabécula, dando lugar a una cavidad lacunar y la aposición posterior forma capas aplanadas o semilunares. En ambos casos, el hueso depositado por los osteoblastos para rellenar la cavidades producidas por los osteoclastos se apone por capas (hueso laminar).

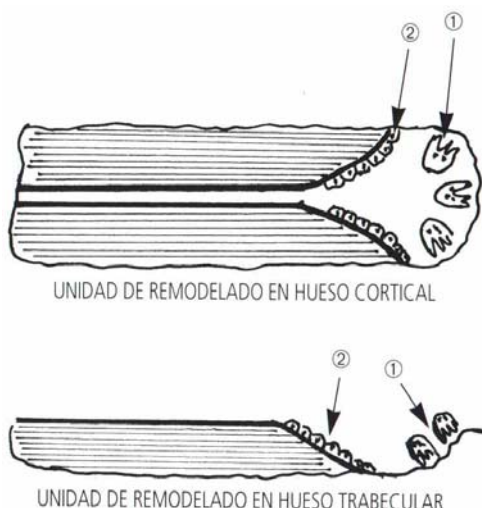


Fig 2. Esquema de unidad de remodelado óseo cortical y trabecular.

(1) osteoclastos, (2) osteoblastos.

El mantenimiento de la masa ósea exige que la cantidad de hueso formada por los osteoblastos sea igual a la destruida por los osteoclastos. Cuando esto no ocurre así, sino que se forma menos hueso del que se destruye (lo que se denomina “balance óseo negativo”), la masa ósea disminuye. En condiciones normales la masa ósea se mantiene hasta los 50 años, momento a partir del cual se instaura un balance negativo. Este balance negativo es el factor determinante de la pérdida de masa ósea que se produce con la edad. Por ello la osteoporosis constituye un ejemplo de remodelado anormal, al igual que la enfermedad periodontal (57) (figura 3).

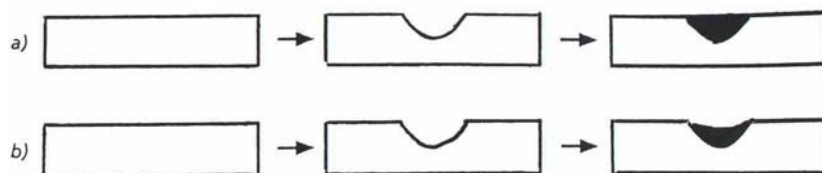


Fig 3. Balance óseo por unidad de remodelado:

- a) balance cero (igual cantidad de hueso formado que destruido).
- b) balance negativo (menor cantidad de hueso formado que destruido).

La pérdida de masa ósea producida por el balance negativo se intensifica en distintos momentos de la vida por la intervención de diferentes fenómenos. Uno de ellos es el aumento del número de unidades de remodelado. Puesto que, cuando en un balance negativo, la puesta en marcha de cada unidad de remodelado supone una pérdida de masa ósea, el aumento del número de dichas unidades da lugar a un incremento de la cantidad total de hueso perdido (figura 4). Esta situación se denomina de “alto recambio” o “alto turnover”, ya que el aumento del número de unidades de remodelado supone una mayor velocidad de renovación del hueso.

El recambio de masa ósea aumenta, en primer lugar, con el envejecimiento. La determinación de los marcadores de remodelado más recientes han permitido comprobar que, en contra de lo que se pensaba hasta hace poco, la senectud cursa con un aumento del recambio óseo. En segundo lugar, y de forma especialmente característica, el recambio óseo aumenta tras la menopausia. Finalmente, hay un tercer tipo de incremento del recambio, que es ocasional, dándose exclusivamente en algunas circunstancias concretas. Es el caso de situaciones como el hipertiroidismo, el hiperparatiroidismo o incluso la simple inmovilización (58).

Al margen del incremento en el recambio, un segundo mecanismo por el que pueden incrementarse las pérdidas de masa ósea, consiste en la acentuación del balance negativo. Este fenómeno sólo parece producirse en determinadas circunstancias anormales, como por ejemplo el hipercortisolismo, sea endógeno o debido a la administración de corticoides (58).

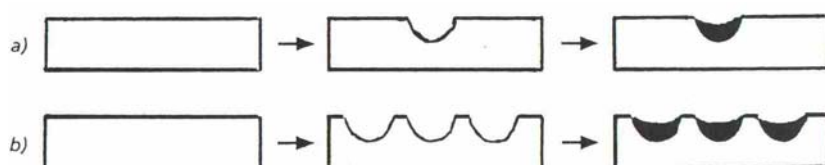


Fig 4. Aumento del recambio óseo en situación de balance negativo: la cantidad de hueso perdida en b) (recambio aumentado), es mayor que en a) (recambio normal).

El balance negativo de las unidades que actúan en el hueso esponjoso origina que las trabéculas se vayan adelgazando. Si el recambio aumenta, el adelgazamiento será más rápido, pudiendo incluso llegarse a la perforación y desaparición de las trabéculas. En algunos casos de aumento del recambio, los osteoclastos realizan recorridos más largos de lo habitual, facilitando la perforación trabecular. La perforación y desaparición de las trabéculas constituye lo que denominamos “desconexión trabecular”. Se trata de un fenómeno de gran trascendencia, ya que la conexión trabecular permite que unas estructuras deriven a otras vecinas parte de la carga mecánica que soportan, de la misma forma que ocurre con los arbotantes de un edificio. Por ello, la pérdida de esta conexión supone un aumento de la fragilidad ósea proporcionalmente mayor al que determinaría la pérdida de masa ósea de cuantía similar pero únicamente debida al adelgazamiento trabecular.

El hueso cortical, en contraposición con el trabecular, es demasiado grueso para ser atravesado por los osteoclastos. Ocasionalmente, sin embargo, los osteoclastos que se activan cerca del endostio (en los sistemas de Havers más profundos), pueden llegar a alcanzar éste, abriéndose por tanto al espacio medular. Cuando ocurre esto, y si el fenómeno es suficiente intenso, la acumulación de múltiples perforaciones puede dar lugar a lo que se denomina “trabeculación” del endostio. En definitiva supone un adelgazamiento de la cortical y simplemente se traduce en un aumento de su porosidad.

Se cree que el aumento del recambio óseo determinado por la menopausia repercute fundamentalmente sobre el hueso trabecular, haciendo que las trabéculas se perforen y desaparezcan, mientras que el determinado por el envejecimiento lo hace más sobre el hueso cortical, ocasionando su trabeculación. El envejecimiento no dejaría de actuar sobre el hueso trabecular, pero en él simplemente determinaría, a diferencia de lo que ocurre con la menopausia, un adelgazamiento de las trabéculas. Las razones de estas diferencias son desconocidas (59).

En cualquier caso, existen una serie de factores relacionados con la regulación del remodelado óseo.

Factores reguladores del remodelado

La función de las células óseas está regulada tanto a nivel sistémico como local. El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales.

Los **factores genéticos** han sido considerados importantes. Así los sujetos de raza negra poseen una masa ósea mayor que la raza blanca y éstos mayor que la amarilla. Se ha postulado como justificación que en la raza negra los niveles plasmáticos de hormona de crecimiento son más altos que en la raza blanca, aunque esto está aún por confirmar (60). La masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello aumenta la predisposición a padecer osteoporosis en hijas de madres que la padecen (61).

Por otro lado, un número de enfermedades óseas como la osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, displasia fibrosa son debidas a anormalidades genéticas. Por ejemplo la disóstosis cleido-craneal se ha relacionado con un defecto del gen *Cbfa1* o *Runx2*, que es fundamental para la diferenciación osteoblástica.

Entre los **factores mecánicos y físicos**, Galileo en el siglo XVII fue el primero en reconocer la relación entre una carga aplicada sobre un hueso y su morfología. En 1683, descubrió una correlación directa entre el peso corporal y el tamaño de los huesos. Durante los dos siglos siguientes, otros autores observaron que el hueso se remodela, pero fue Julius Wolf, anatomista alemán, el primero que relacionó estos dos conceptos vitales. Observó que los cambios de la masa ósea se acompañaban de cambios en la carga, a través de un proceso de remodelación esquelética. En de “The Law of Bone Formation”, publicado en 1892, Wolf afirma: “Cada cambio en la función de un hueso es seguido por ciertos cambios definidos en la arquitectura interna y en la conformación externa, de acuerdo con leyes matemáticas”.

Existen fuerzas internas así como fuerzas externas dinámicas y estáticas que actúan sobre el hueso. Las fuerzas internas son creadas por la contracción muscular; las fuerzas externas, por el campo gravitatorio terrestre y por las fuerzas dinámicas de compresión al soportar peso. La reducción en el soporte de peso por inactividad o la inmovilización conduce a un adelgazamiento progresivo, siendo las trabéculas que soportan peso las primeras en reabsorberse (62).

Las fuerzas mecánicas también desempeñan un papel significativo en la modelación externa del hueso. Por ejemplo, la fuerza dinámica aplicada de contracción de los músculos glúteos influye sobre el tamaño y la forma del trocánter mayor. Si estos músculos están paralizados durante el desarrollo esquelético (como ocurre en ciertos tipos de poliomielitis), el trocánter mayor no alcanza su tamaño y forma normales. Así, se ha observado que la actividad física es imprescindible para el correcto desarrollo del hueso. Se cree que la acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del fluido óseo, estimulando tanto su actividad como la de los osteoblastos y dando origen a una mayor formación ósea. Y al contrario, la falta de actividad muscular, el reposo o la falta de gravedad tiene un rápido efecto sobre el hueso, acelerando la reabsorción (63). Del mismo modo, se ha comprobado que el estímulo eléctrico activa la formación ósea (64).

La **vascularización** es fundamental para un desarrollo óseo normal. Permite el aporte de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. Igualmente la neoformación vascular es el primer hecho en el fenómeno de reparación de fracturas, mediada por VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) entre otros.

El **factor nutricional** es interesante porque puede ser modificado. Se necesita un mínimo de calcio para permitir la mineralización. Existen unas recomendaciones de las necesidades diarias de calcio para todos los grupos de edad. Estos valores reflejan la cantidad promedio de calcio necesaria para mantener un balance de calcio positivo y evitar la pérdida de depósitos minerales almacenados en el hueso. Para adultos y jóvenes son de 750 a 1000 mg/día.

La absorción de calcio desde el tracto gastrointestinal se hace menos eficiente con la edad; así, las personas mayores necesitan más calcio en la dieta para mantener el balance de calcio. Las mujeres premenopáusicas sanas mayores de 30 años, requieren hasta 1000 mg/día, las embarazadas y las mujeres de más de 50 años necesitan más de 1500 mg/día. Las mujeres lactantes necesitan 2000 mg/día para evitar un catabolismo óseo exagerado. Además la cafeína, el exceso de sal y el tabaco son deletéreos para el hueso.

Los **factores hormonales** son de gran importancia (tabla III). La homeostasis ósea está condicionada por el normal funcionamiento del sistema endocrino, fundamentalmente la hormona somatotropa y las hormonas calcitrópicas, que actúan como reguladores sistémicos del remodelado óseo (65).

1,25(OH)₂ vitamina D₃: La vitamina D ejerce importantes efectos sobre el hueso a través de su metabolito biológicamente activo, la 1,25-hidroxivitamina D₃ o calcitriol. En el hueso el calcitriol activa el osteoclasto indirectamente, mediante receptores existentes en los osteoblastos que estimulan a los osteoclastos maduros y, directamente, actuando sobre la diferenciación del preosteoclasto (66,67). A su vez, la vitamina D favorece la absorción de calcio y fosfato y por tanto la mineralización del hueso.

Parathormona (PTH): La secreción de PTH, está regulada por la concentración de calcio iónico, por lo que juega un papel importante en el mantenimiento de los niveles plasmáticos de éste, actuando a nivel de intestino, riñón y hueso. Su efecto principal sobre el hueso consiste en favorecer la reabsorción del mismo aumentando el número y la actividad de los osteoclastos de forma indirecta, es decir, a través del estímulo de osteoblastos que liberan sustancias activadoras de la reabsorción ósea. Sin embargo en los últimos años se ha descubierto un papel estimulador en la formación ósea a dosis bajas, a través de la síntesis de IGF-I y TGF-β (68).

Calcitonina: La calcitonina es otra hormona que tiene acciones contrarias a las de la PTH. Las células parafoliculares del tiroides sintetizan calcitonina y su secreción se halla bajo el control directo del calcio sanguíneo: un incremento en los niveles del mismo produce un aumento de la síntesis de calcitonina y viceversa. Su efecto

fundamental sobre el hueso consiste en inhibir directamente la reabsorción ósea, inhibiendo la proliferación y actividad de los osteoclastos.

Hormonas sexuales: La pérdida ósea que sufren las mujeres postmenopásicas y la prevención de dicha pérdida mediante el empleo clínico de estrógenos constituyen dos pruebas evidentes de la influencia de estas hormonas sobre el metabolismo óseo. Su mecanismo de acción a nivel de hueso es controvertido y todavía no está del todo claro, aunque sí se conoce que estimulan la proliferación osteoblástica favoreciendo de este modo la formación ósea, disminuyen la reabsorción de hueso y producen un aumento de la osteoprotegerina (OPG) por parte de los osteoblastos. Se ha postulado que, al haber un déficit de estrógenos, aumentan los niveles de PTH y por tanto la reabsorción ósea. Por otra parte, se conoce que los estrógenos estimulan la secreción de calcitonina; su disminución impide, pues, la acción inhibitoria de la reabsorción que induce dicha hormona. Asimismo se han hallado receptores de estrógenos en células osteoblásticas por lo que el déficit de estrógenos tal vez pueda actuar inhibiendo la formación ósea. Actualmente también se considera la posibilidad de que la falta de estrógenos disminuya el TGF- β o aumente la PGE₂, IL-1, IL-6 u otras citoquinas pro-reabsorción.

Glucocorticoides: A dosis terapéuticas inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, por lo que disminuyen la formación ósea y aumentan la reabsorción, tal vez por un mecanismo directo o a través de la inhibición de la absorción intestinal de calcio. A dosis fisiológicas e intermitentes, sin embargo, tienen capacidad osteogénica (66).

Hormona de crecimiento: Parece actuar directamente sobre los osteoblastos a través de receptores específicos estimulando su actividad (70), e indirectamente estimulando la síntesis de IGF-I y II por los propios osteoblastos, favoreciendo la proliferación y diferenciación de los mismos.

FACTORES HORMONALES	EFECTOS ÓSEOS
Hormonas tiroideas	↑ Matriz osteoide
PTH	↓ Matriz osteoide ↑ Reabsorción
Calcitonina	↓ Reabsorción
1,25(OH) ₂ D ₃	↑ Mineralización
Insulina	↑ Matriz osteoide
Glucocorticoides	↑ Reabsorción
Andrógenos	↑ Formación
Estrógenos	↑ Formación
Progesterona	↑ Formación
GH	↑ Formación

Tabla III. Factores hormonales (Tresguerres) (28)

Por otra parte actualmente se sabe que una gran variedad de factores locales intervienen en la regulación de las células óseas. Entre estos destacan los factores de crecimiento y las citoquinas. Los primeros son polipéptidos sintetizados en diferentes tejidos, incluido el hueso, mientras que las citoquinas se sintetizan en linfocitos y otras células mononucleares. Pueden ser mitógenos e influir en la proliferación celular o morfógenos, que influyen más en la diferenciación celular.

Factores de crecimiento : Son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extraóseos, que actúan como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente crecimiento y diferenciación.

Citoquinas: Son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas que representan un importante papel en múltiples funciones celulares, como la respuesta inmunológica, la inflamación y la hematopoyesis, con un efecto autocrino y paracrino, pero también endocrino. En el hueso son importantes las siguientes:

- Interleuquina 1: Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, aunque no tiene efecto sobre los osteoclastos maduros (71). En realidad son 3 moléculas relacionadas: IL-1 α , IL-1 β y Antagonista del IL-1, siendo esta última inhibidora de las dos primeras (56).
- Interleuquina 6: Estimula la reabsorción y se ha implicado en la patogenia de la enfermedad de Paget (37). Se cree que representa un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis (72). Se produce en respuesta a PTH, IL-1, y 1,25(OH)₂ vitamina D₃.
- Interleuquina 11: De reciente descubrimiento, se produce en la médula ósea e induce la formación de osteoclastos (73).
- Factor Estimulador de Colonias de Granlocitos y Macrófagos (CSF-GM). Es importante para la osteoclastogénesis y puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis (56).
- Prostaglandinas: In vitro favorecen la reabsorción ósea, debido a un aumento de la síntesis de AMP-c sobre todo la PGE₂, pero también la PGE₁, PGG₂, PGI₂, PGH₂ (74).

Todo este proceso puede ser evaluado desde el punto de vista clínico-experimental identificando algunos metabolitos que se pueden considerar como marcadores bioquímicos de remodelado (tabla IV). En los últimos años se han desarrollado numerosos marcadores bioquímicos que permiten analizar de forma sensible y específica la actividad metabólica ósea. Estos marcadores bioquímicos son proteínas que provienen de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos o bien son productos generados durante la formación o degradación de la matriz ósea. Aquellos que se derivan de la actividad de los osteoblastos se denominan marcadores de formación y los que se derivan de la actividad osteoclástica, marcadores de reabsorción. Todos los marcadores de formación se determinan en suero mientras que la mayoría de los marcadores de reabsorción se determinan en orina (75).

<i>FORMACIÓN.</i>	<i>RESORCIÓN.</i>
SUERO	SUERO
<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa alcalina total • Fosfatasa alcalina ósea (ALP) • Osteocalcina (OCN) • Propéptido carboxiterminal del procolágeno I (PICP) • Propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) • Calcio/Creatinina 	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) • Telopéptido carboxiterminal colágeno I (ICTP)
	ORINA
	<ul style="list-style-type: none"> • Hidroxiprolina • Piridinolina (PYR) • Desoxipiridinolina (D-PYR) • Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (ICTP) • Telopéptido aminoterminal del colágeno I (INTP)

Tabla IV. Marcadores óseos (Tresguerres) (28)

Podemos considerar como marcadores de formación ósea:

Fosfatas alcalinas (ALP): Las fosfatasas alcalinas son un grupo de proteínas enzimáticas ampliamente distribuidas en los tejidos que se localizan en la membrana celular, donde parecen tomar parte en los mecanismos de transporte en los que participa el fósforo. Existen varias formas de fosfatasa alcalina: las no específicas de tejido, que engloban a la ósea, hepática y renal; las de origen intestinal; las placentarias y las de las células germinales. Aunque se desconoce la función exacta de la isoenzima ósea, su relación con los procesos de formación y mineralización ósea es más que probable. Así el déficit de ALP denominado hipofosfatasa puede asociarse a una alteración severa de la mineralización ósea y diversos estudios han establecido una relación entre la actividad de la ALP ósea y la función osteoblástica. Sin embargo, cuando se determina la actividad de la ALP total en suero de individuos sanos, ésta deriva fundamentalmente de las isoenzimas ósea y hepática, con una proporción variable que suele ser del 50% dependiendo de la edad. Además, en un 20-25% de la población puede detectarse la isoenzima intestinal. Por lo tanto, el incremento de la actividad de la ALP en suero puede ser la expresión de una amplia variedad de procesos (76).

La ALP total suele ser normal en la osteoporosis, mostrando una baja sensibilidad y especificidad en este proceso. A pesar de ello, la actividad de la ALP total en suero es un marcador clásico de formación ósea y todavía hoy uno de los más utilizados en la práctica clínica (76).

Osteocalcina (OCN): Es la proteína no colágena de la matriz ósea más abundante de tal forma que constituye del 1 al 2% de las proteínas totales de la matriz. Se sintetiza exclusivamente por los osteoblastos y odontoblastos (77) y aunque se desconoce su función exacta se ha sugerido que podría intervenir en la regulación de la mineralización ósea. Esta proteína contiene tres residuos de ácido gamma-carboxiglutámico, siendo la vitamina K esencial para su carboxilación y ello es importante pues se ha sugerido que sólo la osteocalcina totalmente carboxilada se incorpora a la matriz ósea. Además su síntesis está influenciada por la 1,25-dihidroxitamina D.

Se ha demostrado que la osteocalcina sérica es un marcador sensible y específico de actividad osteoblástica. Así sus valores tienen una buena correlación con los parámetros de formación ósea analizados mediante histomorfometría (78). La concentración sérica de osteocalcina está aumentada en los procesos caracterizados por un incremento del recambio óseo, como ocurre en el hipertiroidismo o la postmenopausia reciente, por lo que algunos autores también han indicado que podría tratarse de un marcador de remodelado óseo. Este hecho ha sido atribuido a que tras la reabsorción ósea también pueden liberarse fragmentos de osteocalcina provenientes de la matriz proteica. La excepción la constituye la enfermedad ósea de Paget, pues la concentración de osteocalcina es más baja de la que correspondería por el grado de recambio óseo, y en definitiva la osteocalcina es un marcador con poca sensibilidad diagnóstica en esta enfermedad. Aunque se desconoce el motivo de su falta de correlación con la fosfatasa alcalina en la enfermedad de Paget, se ha sugerido que ambas proteínas podrían representar estadios diferentes del desarrollo y de la actividad sintetizadora de los osteoblastos (79).

Se ha descrito que los residuos de ácido gammacarboxiglutámico de la osteocalcina son los responsables de su alta afinidad por la hidroxiapatita del tejido óseo y si bien su significado es incierto, el aumento de la osteocalcina no carboxilada en la población de edad avanzada y su correlación negativa con la masa ósea indican una probable influencia de la osteocalcina en la regulación del metabolismo óseo. Así, Vergnaud en un estudio en el que ha analizado la osteocalcina no carboxilada mediante un enzimoimmunoanálisis describe un incremento en la prevalencia de fracturas de fémur en los pacientes que tienen aumentado este marcador, efecto que se correlaciona con la disminución de la masa ósea (80).

Propéptidos terminales del procolágeno I (PICP y PINP): El colágeno se sintetiza por el osteoblasto en forma de un precursor, la molécula de procolágeno, que tiene unas secuencias adicionales en ambos extremos. Una vez secretada por los osteoblastos, estos péptidos terminales se separan de la molécula por acción de unas enzimas específicas dando lugar a la molécula de colágeno que se ensamblará en fibrillas y fibras. Estos péptidos de las regiones carboxiterminal (PICP) y aminoterminal (PINP) pasan a la sangre donde pueden ser medidos por radioinmunoanálisis (81). Aunque en teoría ambos marcadores deberían reflejar la formación de colágeno I y por

tanto, la formación ósea de una forma muy adecuada, los estudios en los que se ha analizado la sensibilidad diagnóstica y las modificaciones de los niveles de la PICP en situaciones clínicas con un cambio brusco del recambio óseo, han mostrado una escasa sensibilidad de este marcador. Además, en pacientes con osteoporosis los niveles séricos de PICP se correlacionan débilmente con los parámetros histológicos de formación ósea y aunque se ha descrito un ligero aumento de los niveles de este marcador en la postmenopausia, un estudio más reciente no ha confirmado este hallazgo (81).

Se tiene escasa información sobre la utilización del PINP como marcador de formación ósea pero los resultados son alentadores. Así, al analizar la sensibilidad de los diferentes marcadores de formación ósea en un grupo de mujeres con menopausia quirúrgica reciente, el PINP fue el marcador más sensible superando a la fosfatasa alcalina ósea, a la osteocalcina y al PICP (82). Además, cuando se analizó la sensibilidad diagnóstica de los marcadores de formación ósea y se relacionó con los índices de actividad gammagráfica en la enfermedad ósea de Paget, el PINP fue el marcador de formación ósea que estaba aumentado en un mayor porcentaje de pacientes. A pesar de estos resultados, se precisan más estudios que avalen esta información.

Como marcadores de reabsorción ósea podemos considerar:

Fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP): Durante el proceso de reabsorción ósea los osteoclastos secretan ácidos y enzimas al espacio existente entre su borde en cepillo y la superficie ósea. En concreto, la fosfatasa ácida se ha identificado tanto en la membrana del borde en cepillo del osteoclasto como en las secreciones del espacio de reabsorción, lo que sugiere que esta enzima interviene en la degradación de la matriz ósea. Asimismo se ha observado un incremento de la expresión de la fosfatasa ácida en el osteoclasto cuando la reabsorción ósea aumenta (83), por lo que se ha señalado que su determinación constituye una medida específica de la actividad osteoclástica.

Las fosfatasas ácidas son un grupo de enzimas que se encuentran en el osteoclasto, la próstata, las plaquetas, los eritrocitos y el bazo. A diferencia de la

isoenzima prostática la fracción ósea es resistente a la acción del tartrato. Su actividad en suero está aumentada en las condiciones esqueléticas en las que existe un alto recambio óseo. Así, se ha descrito que sus niveles están elevados en pacientes con hiperparatiroidismo y en la osteoporosis postmenopáusica (84).

Recientemente se ha desarrollado un enzimoimmunoanálisis (ELISA) que utiliza anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la isoenzima ósea de la fosfatasa ácida con lo cual este marcador promete ser muy válido para la valoración de actividad osteoclástica (84).

Hidroxiprolina: La determinación de la excreción urinaria de hidroxiprolina, aminoácido muy abundante en el colágeno ya que representa el 13% del contenido de aminoácidos de la molécula, es el marcador tradicional de reabsorción ósea. Durante la degradación de la matriz ósea, la hidroxiprolina pasa a la circulación sanguínea tanto en forma libre como unida a péptidos. La hidroxiprolina libre, que constituye el 90% del total, se filtra por el glomérulo y se reabsorbe casi en su totalidad metabolizándose en el hígado a dióxido de carbono y urea. De manera que sólo un 10% de la hidroxiprolina derivada de la degradación del colágeno se excreta por la orina bien en forma libre o bien unida a péptidos dializables (de pequeño tamaño, 90%) o no dializables (de gran tamaño). En principio, la fracción unida a péptidos dializables es la que refleja la degradación del colágeno de la matriz ósea durante el proceso de reabsorción.

A pesar de su amplia difusión es un marcador con limitaciones. En primer lugar, es poco específico del tejido óseo pues no sólo está presente en todos los tipos de colágeno, sino que además se halla en proteínas que contienen en su estructura secuencias de triple hélice parecidas a la del colágeno como la fracción C1q del complemento, elastina y acetilcolinesterasa y también la procedente de la dieta. Por último, la técnica colorimétrica es larga, tediosa e imprecisa (85).

Como consecuencia de su origen y metabolismo, se considera que la hidroxiprolina es un marcador poco sensible y poco adecuado para evaluar la reabsorción ósea en la osteoporosis. En este sentido la, hidroxiprolina se correlaciona débilmente con la reabsorción ósea analizada mediante estudios cinéticos o por histomorfometría ósea (85).

Piridinolina y Desoxipiridinolina: Las fibrillas del colágeno maduro del hueso se estabilizan por la formación de puentes de piridinolina y desoxipiridinolina intra e intermoleculares. Estos puentes o enlaces se producen en la mayoría de los tejidos conectivos a excepción de la piel y están presentes en los colágenos tipo I, II y III. Se forman a través de tres residuos de hidroxilisina (piridinolina) o dos residuos de hidroxilisina y uno de lisina (desoxipiridinolina) y se ha demostrado que son resistentes a una degradación posterior en el organismo. Durante la degradación de la matriz ósea estos puentes son liberados a sangre y posteriormente son eliminados en la orina bien en forma libre (piridinolina libre) o bien unidos a fragmentos peptídicos (piridinolina total), donde se determinan por enzimoimmunoanálisis o por cromatografía líquida de alta resolución. Al valorar las piridinolinas en orina deberá tenerse en cuenta cuál de estas piridinolinas (libre frente a total) es la que determina la técnica que estamos utilizando, ya que pueden dar resultados variables en función del remodelado óseo.

Debido a que gran parte del colágeno tipo I del organismo corresponde al tejido óseo y a que su recambio es más rápido en el esqueleto que en el resto de tejidos conectivos del organismo, se consideran que los niveles de piridinolinas en orina derivan básicamente de la reabsorción ósea. En este sentido, su excreción urinaria se correlaciona con la tasa de reabsorción ósea determinada por histomorfometría. Asimismo se ha sugerido que la desoxipiridinolina sería más específica que la piridinolina como marcador de degradación ósea debido a que teóricamente sólo se encuentra en cantidades significativas en el tejido óseo, mientras que la piridinolina se halla también en cartílagos, ligamentos, tendones y otros tejidos blandos. Aunque el hueso es la principal fuente de desoxipiridinolina en orina, no se puede descartar la contribución de otros tejidos del organismo (86).

La determinación de estos dos marcadores ofrece una serie de ventajas respecto a la determinación de hidroxiprolina como son (87):

- a) Sus niveles no están influenciados por la dieta.
- b) No se catabolizan en el organismo, por lo que reflejan una medida directa de la destrucción del colágeno.

- c) Proceden exclusivamente del colágeno maduro.
- d) Son más específicos del tejido óseo.

Su comportamiento en la osteoporosis y en otras patologías óseas ha puesto de manifiesto que son unos marcadores adecuados de reabsorción. Así, la excreción urinaria de piridinolina y desoxipiridinolina está aumentada en la osteoporosis postmenopáusica, en el hiperparatiroidismo, el hipertiroidismo, en la enfermedad de Paget. Además se ha descrito un aumento del riesgo de fractura de fémur en pacientes que presentan edad avanzada con altas concentraciones de desoxipiridinolina libre en orina (87).

Telopéptidos del colágeno I: Estos marcadores derivados de las regiones telopeptídicas del colágeno tipo I contienen un puente piridinolínico o desoxipiridinolínico que les protege de una degradación posterior en el organismo.

El primer marcador que se desarrolló fue el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (ICTP) que se determina en suero. Si bien estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que su concentración en suero se correlaciona con la tasa de degradación de la matriz ósea evaluada por histomorfometría en biopsia ósea (88), tiene escasa especificidad ya que puede originarse de la degradación de cualquier tipo de colágeno que contenga puentes intermoleculares (colágenos tipo II y III) (89). Es más, el ICTP no ha demostrado ser buen marcador en el estudio de la osteoporosis postmenopáusica ni en la enfermedad de Paget.

Los otros marcadores derivados de la región telopeptídica del colágeno tipo I se determinan en orina. Estos marcadores se han desarrollado en los últimos años y han demostrado ser muy sensibles y específicos de la reabsorción ósea.

La determinación del telopéptido carboxiterminal (ICTP) se realiza mediante un enzimoimmunoanálisis que reconoce un péptido formado por ocho aminoácidos del segmento C terminal de una cadena alfa-1 de colágeno, participando uno de estos aminoácidos en la formación de un puente piridinolínico. Sus niveles urinarios muestran

cambios muy marcados en las situaciones con un aumento del recambio óseo como el hipertiroidismo o en el hiperparatiroidismo (90). Además en la postmenopausia quirúrgica reciente es el marcador de reabsorción más sensible.

La determinación del telopéptido aminoterminal del colágeno tipo I (INTP) también se realiza mediante un enzimoimmunoanálisis que utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido frente a un péptido de la región N terminal de la molécula de colágeno I. Se considera que es un marcador muy específico del tejido óseo ya que al derivar de la región aminoterminal contiene más puentes de desoxipiridinolina que la fracción carboxiterminal, y además se ha demostrado que los osteoclastos generan esta secuencia peptídica *in vitro*. Asimismo es un marcador muy sensible y se ha encontrado que es el marcador que más se modifica en las situaciones caracterizadas por un aumento de la reabsorción ósea, como en la postmenopausia (91).

3.1.3. Osteoporosis

La osteoporosis es el proceso metabólico óseo más frecuente y uno de los mayores problemas de salud pública en el momento actual en todo el mundo. En la Conferencia Consenso celebrada en Hong-Kong en 1993, se definió la osteoporosis como una enfermedad sistémica esquelética caracterizada por una masa ósea baja y un deterioro microestructural del hueso, con un aumento consiguiente de la fragilidad ósea y de la susceptibilidad a las fracturas (5).

La O.M.S define como punto de corte para el diagnóstico de osteoporosis densitométrica una densidad de masa ósea (DMO) inferior a -2,5 DE (desviaciones estándar) respecto al adulto joven. Aproximadamente hasta los 30 años existe un aumento progresivo de masa ósea, tras un período de estabilidad, ésta comienza a declinar, pudiendo perderse hasta un 35% de hueso cortical y un 50% de hueso trabecular a nivel sistémico en mujeres. En hombres estos descensos son menores en dos tercios de lo señalado en mujeres. La prevalencia de osteoporosis ha alcanzado actualmente proporciones epidémicas pues afecta aproximadamente al 30% de las mujeres postmenopáusicas y a casi al 50% de las mayores de 75 años (5).

Podemos clasificar la osteoporosis según la tabla V.

OSTEOPOROSIS IDIOPÁTICA O PRIMARIA	OSTEOPOROSIS SECUNDARIA.
<i>Juvenil.</i>	<i>Digestivas:</i> hepatopatía, alcoholismo, malabsorción.
<i>Adulta</i> - Tipo I de Riggs.	<i>Endocrinopatías:</i> hipertiroidismo, hiperparatiroidismo
- Tipo II de Riggs.	<i>Nefropatías</i>
	<i>Genéticas.</i> Sd de Turner, Klinefelter y Marfan.
	<i>Alimentarias:</i> ingesta baja en calcio, déficit de vit D.
	<i>Hematológicas:</i> mieloma, leucemia.
	<i>Farmacológicas:</i> esteroides, citostáticos, barbitúricos
	<i>Tumorales.</i>
	<i>Otros:</i> inmovilidad, artritis reumatoide, etc.

Tabla V. Clasificación de osteoporosis

3.1.3.1. *Osteoporosis idiopática o primaria*

Osteoporosis idiopática del adulto: La pérdida de masa ósea es muy variable según su localización. Así, el hueso cortical sufre una pérdida acelerada durante la menopausia en la mujer, que es más lenta y progresiva en los ancianos. Ello se traduce clínicamente en un aumento de la tasa de fracturas de cuello de fémur en edades avanzadas de la vida. El aumento del recambio óseo que acompaña a la menopausia también produce pérdida de masa ósea precozmente en sitios del esqueleto ricos en hueso esponjoso.

La conocida clasificación de la osteoporosis de Riggs establece dos tipos de osteoporosis: tipo I y tipo II, en función del patrón involutivo (tabla VI).

Osteoporosis tipo I: También se denomina como osteoporosis de *alto remodelado*, ocasionada por insuficiencia ovárica. Este tipo de osteoporosis se relaciona con una mayor reabsorción ósea debida al incremento de la actividad osteoclástica como consecuencia del déficit estrogénico. La pérdida ósea es más acentuada durante los primeros 10 años que siguen a la menopausia.

Sin embargo la deprivación hormonal no es la única causa de este tipo de osteoporosis pues la enfermedad no se produce en todas las mujeres menopáusicas, sino solamente en aquellas que se denominan “perdedoras rápidas de hueso”. Tal vez intervengan en ello factores tan importantes como un capital óseo previo bajo, concentraciones de estrógenos más bajas de lo normal o incapacidad para compensar la pérdida ósea aumentando la formación.

Osteoporosis tipo II: También se denomina de *bajo remodelado*, en la que la pérdida ósea se relaciona fundamentalmente con tres factores: déficit funcional del osteoblasto, disminución en la absorción intestinal de calcio y vitamina D e insuficiencia renal con hiperparatiroidismo secundario.

<i>Clasificación de Riggs</i>		
	<i>TIPO I</i>	<i>TIPO II</i>
<i>Edad</i>	50-56	+75
<i>Mujer/Varón</i>	6/1	2/1
<i>Pérdida de hueso</i>	<i>Trabecular Acelerada</i>	<i>Trabecular y Cortical No acelerada</i>
<i>Tipo de fractura</i>	<i>Vertebral</i>	<i>Vertebral y cadera</i>
<i>Niveles de PTH</i>	<i>Disminuidos</i>	<i>Aumentados</i>
<i>Absorción de calcio</i>	<i>Disminuida</i>	<i>Disminuida</i>
<i>Vitamina D</i>	<i>Reducida</i>	<i>Reducida</i>
<i>Etiología</i>	<i>Menopausia</i>	<i>Pérdida ósea con la edad Hiperparatiroidismo 2º</i>

Tabla VI. Clasificación de Riggs de la osteoporosis

Osteoporosis idiopática juvenil: Es menos frecuente. Por lo general afecta a los niños hasta que alcanzan la adolescencia, remitiendo posteriormente de forma espontánea. Clínicamente se manifiesta por aplastamientos vertebrales múltiples.

3.1.3.2. Osteoporosis secundaria

Osteoporosis asociada a hipercortisolismo: El exceso de glucocorticoides observado en el transcurso de ciertas endocrinopatías o bien cuando estos medicamentos son administrados para el tratamiento de enfermedades concretas, conlleva indefectiblemente una pérdida de masa ósea.

La etiopatogenia de la osteoporosis inducida por esteroides es multifactorial. Entre los diversos efectos de estas sustancias son de especial interés para el metabolismo óseo los siguientes: inhibición del osteoblasto y estimulación de la actividad osteoclástica, aumento de la sensibilidad de las células óseas a la PTH y vitamina D, disminución de la absorción intestinal de calcio, incremento de la

eliminación urinaria de calcio, estimulación directa de la producción de PTH y disminución de la producción de hormonas sexuales (92).

Osteoporosis asociada a diabetes mellitus: Aunque su origen parece ser multifactorial, probablemente el elemento que más intervenga en su patogenia sea el déficit de insulina, pues se ha demostrado que los osteoblastos poseen receptores para esta hormona que promueve el desarrollo de estas células y la síntesis de matriz ósea (93).

Osteoporosis y hormonas tiroideas: En el hueso las hormonas tiroideas incrementan la actividad osteoblástica, estimulan la reabsorción ósea y en consecuencia, aumentan el remodelado óseo. Tanto en las situaciones clínicas que cursan con hiperfunción tiroidea como en los casos en que hay que emplear tratamiento sustitutivo con L-tiroxina, se produce una pérdida de masa ósea. El origen de la misma suele ser el aumento del catabolismo proteico y la pérdida de calcio (94).

Osteoporosis por inmovilización: La inmovilización sufrida por enfermos que han padecido, por ejemplo, traumatismos medulares o accidentes cerebrovasculares se asocia con una importante pérdida de masa ósea. El hallazgo habitual en estos pacientes es el incremento de reabsorción ósea que cursa con hipercalciuria e hidroxipolinuria (95).

Osteoporosis asociada a hepatopatía crónica: En todas ellas la etiología de la osteoporosis es múltiple: déficit de hidroxilación hepática de la vitamina D, disminución en la absorción intestinal de la misma y alteración en la síntesis de su proteína transportadora, consumo de alcohol, malabsorción de calcio con hiperparatiroidismo secundario y aumento de los niveles circulantes de cortisol (96).

3.1.3.3. Factores de riesgo

Los estudios epidemiológicos en la osteoporosis tienen como principal finalidad el conocimiento de frecuencia y distribución de esta enfermedad, así como los determinantes de la misma. Con el desarrollo de las técnicas de medición de masa ósea, se ha dado una tendencia creciente a definir la osteoporosis en términos de contenido mineral óseo (CMO) o densidad mineral ósea (DMO). Actualmente el concepto de osteoporosis se define como “una masa ósea baja y alteración estructural del tejido óseo, con un incremento consecuente de la fragilidad y susceptibilidad a las fracturas” (Conferencia de Consenso de Copenhague en 1990) (97).

Los factores de riesgo relacionados con la osteoporosis se pueden observar en la tabla VII.

<i>Factores de riesgo de osteoporosis</i>
<i>Edad avanzada</i>
<i>Genéticos:</i> Blanca > Negra Mujeres > Hombres Amarilla > Blanca
<i>Constitución:</i> Estatura pequeña, Bajo peso, Piel fina
<i>Hormonas:</i> ↓ Estrógenos, ↓GH
<i>Dieta:</i> Ingesta deficiente de leche, exceso de sal y café
<i>Estilo de vida:</i> Tabaquismo, Alcoholismo, Sedentarismo
<i>Fármacos:</i> Corticoides, Anticomiciales, Heparina
<i>Enfermedades:</i> Gastrectomía Fallo renal Diabetes Malabsorción Hipertiroidismo – Hiperparatiroidismo Hipogonadismo Mieloma Metástasis osteolíticas

Tabla VII. Factores de riesgo

Aproximadamente un 70% de todas las fracturas por encima de los 45 años se asocian a osteoporosis, si bien es cierto que no es la única circunstancia que se requiere para que se produzca la fractura. Un fenómeno paralelo ocurre con la hipertensión arterial y el accidente vascular cerebral.

La OMS define como punto de corte para el diagnóstico de *osteoporosis* densitométrica un contenido o DMO inferior a -2.5 DE (desviaciones estándar por debajo del valor medio de la masa ósea máxima alcanzada en mujeres jóvenes sanas (pico de masa ósea), respecto a la mujer adulta joven). El concepto diagnóstico de *osteopenia* se refiere a valores de densidad ósea entre -1 y -2.5 DE respecto al pico de masa ósea y el de *normalidad* a aquellos valores de DMO superiores a -1 DE. Por debajo de ese umbral, se produce ya el sustrato anatómico de suficiente fragilidad para que un trauma mínimo fracture el hueso.

Disponiendo de los valores de normalidad de la DMO lumbar y de cuello de fémur de la población española determinada por técnicas de densitometría radiológica de doble energía (DEXA), especialistas de la Universidad de Córdoba, evaluaron la prevalencia de osteopenia y osteoporosis densitométrica en una muestra aleatoria de 254 mujeres mayores de 50 años del municipio de Oviedo (98) (figuras 5,6,7).

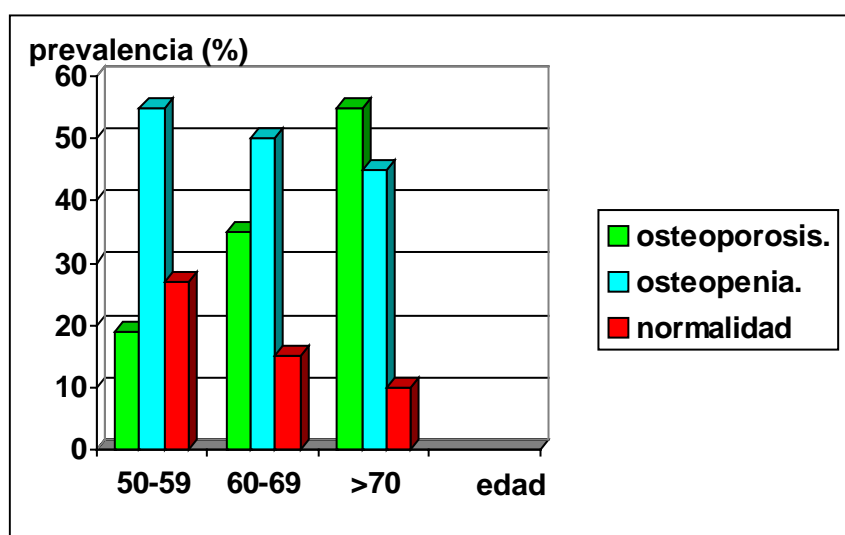


Fig 5. Prevalencia de osteoporosis, osteopenia y normalidad densitométrica en columna lumbar y cuello femoral de acuerdo con los criterios de la OMS.

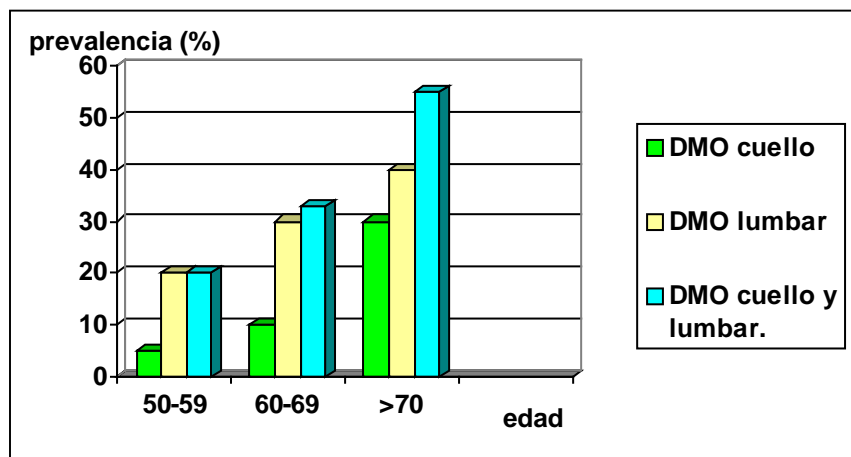


Fig 6. Porcentaje de osteoporosis (DMO < 2.5 DE respecto al pico de masa ósea de la población adulta joven de España) a nivel de cuello femoral, de columna lumbar o en cualquiera de las dos, según los grupos de edad.

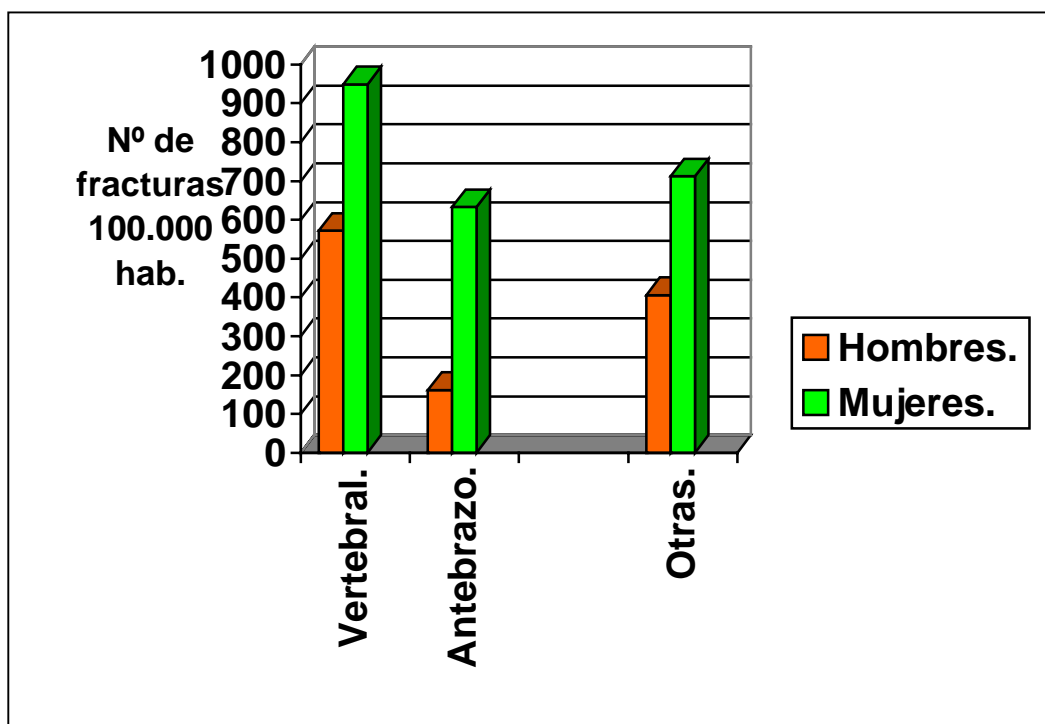


Fig 7. Tasa de incidencia anual de fractura vertebral, antebrazo y de otras fracturas osteoporóticas en hombres y mujeres del municipio de Oviedo.

En estudios epidemiológicos realizados en España, con la utilización de medidas morfométricas y según parámetros de masa ósea conocidos, Rico y cols, demuestran una incidencia de un 29% en las mujeres por encima de 45 años de edad. Estos datos son referidos a la osteoporosis involutiva, lógicamente las secundarias (inmovilización, corticoides, etc.) elevan considerablemente la incidencia (99).

No se sabe con seguridad en qué momento se inicia el aumento del recambio óseo que, de acuerdo con el comportamiento de los marcadores óseos, parece establecerse con la edad. Tampoco se conocen sus factores responsables, pero se cree que el principal determinante del mismo es el incremento de la secreción de PTH que tiene lugar con el envejecimiento. La disminución de GH también se ha descrito como factor de pérdida ósea asociado a la edad (somatopausia) (100). Igualmente es posible que contribuya la disminución de la actividad física propia de la edad, ya que se sabe que el reposo estimula la actividad de las unidades de remodelado. Las causas del aumento de PTH probablemente son varias:

- *Disminución de la función renal.* Con la edad disminuye la filtración glomerular, lo que origina un cierto grado de hiperparatiroidismo secundario.
- *Disminución de la absorción intestinal.* Los factores responsables de esta disminución son en parte atribuibles a la propia mucosa intestinal y en parte ajenos a ella. Los primeros guardan relación con el desarrollo de resistencia a la vitamina D por las células del intestino, como consecuencia de la edad. Los segundos se refieren a la menor disponibilidad en el organismo de esta vitamina y sus metabolitos como consecuencia de la dieta y menor exposición a la luz solar de las personas ancianas. También se le atribuye una disminución en la capacidad de la piel para sintetizar vitamina D con el paso de los años. Estudios dietéticos han puesto de manifiesto que la cantidad de calcio de la dieta disminuye con la edad, especialmente en la mujer. Se ha observado que son frecuentes los aportes diarios de tan sólo 400-500 mg, muy alejados de los 1500 mg recomendados.
- *Pérdida tubular de calcio.* Hay una tendencia a la pérdida renal de calcio en personas ancianas.

- *Menopausia*. La caída de los niveles estrogénicos determina un incremento del recambio óseo, con el consiguiente paso de calcio del hueso a la sangre; este calcio que entra en exceso en la sangre, inhibe la secreción de PTH, cuyo descenso a su vez supone un cese en el estímulo de metabolización de 1,25-(OH)D₃ por el riñón, lo que origina menor absorción de calcio por el intestino y un balance negativo del mismo.

Actualmente también se considera la posibilidad de que la falta de estrógenos disminuya el TGF-beta, o aumente la PG2, IL-1, IL-6 u otras citoquinas pro-reabsorción (101,102).

Para el hueso cortical existe una fase de pérdida lenta de masa ósea en ambos sexos, que se inicia a los 40 años y que inicialmente es de un 0.3 a un 0.5% por año. Con la edad se incrementa esta pérdida para finalmente estabilizarse en edades avanzadas. En la mujer postmenopáusica a esta pérdida lenta se superpone una fase acelerada con unos descensos del 2 o 3% anuales durante 8 o 10 años. En el hueso trabecular el inicio de pérdida de masa ósea es más precoz que en el hueso cortical (99).

Existe una creciente demanda de tratamientos implantológicos en la sociedad actual, tanto por parte de hombres como de mujeres. Las edades entre las que se solicita este tipo de tratamiento oscilan entre los 50 y 80 años generalmente. Esta situación nos lleva a tratar con mujeres postmenopáusicas con posible afectación de osteoporosis.

Así Sada Moreno en un estudio retrospectivo sobre 197 pacientes con mil implantes colocados, observó que 108 (54,9%) eran mujeres y 89 hombres (103).

Steven en una revisión de 631 implantes, colocados sobre 445 observó que el 59,2% de los implantes se realizaron en mujeres y el 40,8% en varones (104).

Pina encuentra mayor demanda de tratamiento implantológico en mujeres que llega hasta un 63,2% (105).

Chanavaz en una revisión de su experiencia quirúrgica desde los años 79-94, nos muestra los resultados de elevaciones de seno maxilar para posterior colocación de implantes de 402 pacientes. De éstos, el 64,1% eran mujeres (106).

Los resultados de estas revisiones ponen de relieve la importancia que tiene la demanda de tratamiento implantológico en mujeres susceptibles de padecer osteoporosis. Esto justificaría la realización de un modelo de osteoporosis experimental animal para estudios de implantología, con la finalidad de estudiar la osteointegración de los implantes en condiciones de bajo metabolismo óseo así como la evaluación de distintas estrategias de regeneración ósea en estas circunstancias.

3.1.3.4. Afectación mandibular en la osteoporosis

Aunque la osteoporosis es un problema de primer orden en la sanidad pública, el efecto de esta condición en los maxilares es controvertido.

La relación entre la densidad ósea mandibular y la osteopenia esquelética se ha establecido en algunos estudios clínicos (107,108), pero no en otros (109). Estas discrepancias se pueden deber a la dificultad del estudio de la pérdida de hueso en la mandíbula durante el desarrollo de la osteoporosis y a diferentes variables que actúan como elementos de confusión, incluyendo genética, dieta, nutrición, terapias previas de enfermedad periodontal, caries e historia de medicación previa.

Los estudios realizados hasta la fecha por diversos autores, no han conseguido unificar una postura clara acerca de la afectación o no de los maxilares, (en concreto de la mandíbula), durante el desarrollo de esta enfermedad. En un modelo de osteoporosis por deplección de estrógenos en ratas por medio de ovariectomías, Miller y cols, (1991) notaron un incremento del turnover óseo en la mandíbula al poco tiempo de la realización de las ovariectomías (110), mientras que Elovic y cols (1995) relatan algunas reducciones en el área ósea y en la rigidez pasado bastante tiempo tras la ovariectomía (111). Hay también algunos estudios en humanos que demuestran correlación entre los cambios producidos en los tejidos orales con aquellos que ocurren sistémicamente (107), mientras que otros encuentran estas asociaciones menos convincentes (112).

Los estudios sobre la afectación mandibular y la osteoporosis se han ido sucediendo desde 1968, en donde ya Atkinson y Woodhead (113) daban una opinión sobre el tema sugiriendo que la pared vestibular del hueso alveolar de la mandíbula se hacía más porótica con la edad que la basal de la mandíbula. Hasta la fecha, se pensaba que estos efectos sobre la mandíbula eran sólo consecuencia del paso del tiempo, sin embargo en 1978, Von Wowern y Stoltze (114) expusieron que la masa de hueso cortical de la mandíbula disminuye con la edad, sin embargo el hueso trabecular mostraba una variación que era independiente de la edad. Esto significa que la relación edad-pérdida ósea trabecular en la mandíbula no puede ser demostrado en estudios transversales. También en 1978 se formularon hipótesis contrarias; así Rosenquist (115) enfatiza la importancia de factores locales en la reabsorción de la cresta residual junto con alteraciones sistémicas. Diversos factores hacen menos clara la participación de la osteoporosis en la afectación mandibular: diferencias en el volumen óseo original, en la función muscular, dieta, historia de extracciones y efectos hormonales diferentes a los producidos en la menopausia. En 1989, Humpheries (112) demostró en un estudio radiográfico que la edad del sujeto afectaba significativamente a la reabsorción de la cresta residual en las mujeres pero no en la de los hombres, queriendo demostrar que la reducción de la cresta ósea residual ocurre más rápidamente en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis generalizada. Es también en 1989 cuando Kribbs, inició lo que sería una larga investigación sobre el papel representado por la osteoporosis en la pérdida de hueso mandibular. Según Kribbs (116) la disminución de masa ósea en la mandíbula no está correlacionada con la edad. De acuerdo con ella, la masa ósea de la mandíbula es más dependiente del estado de los tejidos óseos en todo el cuerpo, que de la edad. Recientes estudios llevados a cabo por Kribbs (117), demuestran que en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis, la masa ósea mandibular, es mejor indicador de la masa esquelética que la BMD (densidad de masa ósea) mandibular. La altura de la cresta residual, según Kribbs, se correlaciona con el TBC (calcio total en el cuerpo), sugiriendo que los individuos con osteoporosis severa, conservan menos hueso residual una vez que se le extraen los dientes, que los que no presentan esta enfermedad.

Menos convincentes encuentra estas afirmaciones Mohaerty (109), que en 1992 realizó un estudio en mujeres de mediana edad con media o moderada osteoporosis postmenopáusica. El resultado del estudio no evidenció diferencias entre las mujeres

que presentaban la enfermedad y las del grupo control, que no la presentaban, en mediciones de densidad de hueso trabecular de la mandíbula y hueso cortical valoradas mediante radiografías panorámicas y periapicales.

Klemetti en 1993 (112), en un estudio sobre un total de 74 mujeres postmenopáusicas parcialmente desdentadas tampoco encontró diferencias entre éstas y el grupo control, y considera que la reabsorción de la cresta residual responde a otros factores diferentes de la osteoporosis generalizada.

Elovic en 1995 (111), en un estudio en ratas ovariectomizadas observó que la deplección de estrógenos contribuía a la pérdida de hueso mandibular y que la edad podría acentuar esa pérdida. Sin embargo admite que las cargas oclusales podrían proteger a la mandíbula de la pérdida de integridad estructural debido a la deplección de estrógenos, aunque esto requiere mayor investigación. Sin embargo, se podría considerar la función oclusal como un factor potencial de confusión en la evaluación de las pruebas clínicas.

Como continuación de sus investigaciones, Kribbs de nuevo en 1996 (118), realizó un estudio comparando 112 mujeres entre los 50 y los 85 años. Se realizaron dos grupos de estudio, un grupo fue diagnosticado como osteoporótico por evidencias radiográficas basadas en lesiones vertebrales (compresiones, aplastamientos), mientras que el otro grupo no presentaba evidencias radiográficas. Los resultados de la investigación indicaron, que el grupo osteoporótico, presentaba menor masa ósea mandibular, menor densidad ósea y una cortical más fina en el gónion mandibular con respecto al grupo de mujeres sin evidencias radiográficas de la enfermedad. El grupo de mujeres osteoporóticas presentaba además un número más elevado de pacientes edentulas, y aquellas que presentaban dientes naturales, contaban con gran cantidad de ausencias dentarias (118).

Estudios realizados por Gilles en 1997 con ratas ovariectomizadas, demostraron que la deficiencia de estrógenos incrementaba la pérdida de hueso (119).

También se ha sugerido que cambios en la densidad de hueso alveolar y de los niveles de citoquinas de reabsorción ósea en saliva, podrían ser secundarios a cambios

de la menopausia. Estos cambios predisponen a la pérdida de hueso alveolar con la consiguiente pérdida de dientes (120).

Jeffcoat, en 1998 (121), revisa los factores de riesgo de la osteoporosis y periodontitis, y concluye que la pérdida de hueso oral puede estar relacionada con la osteopenia sistémica. Hay también evidencia de que el reemplazo de hormonas y la administración de bifosfonatos se asocia a una disminución de la pérdida de hueso alveolar y una disminución de pérdidas dentales.

3.1.3.5. *Osteoporosis experimental*

Saville (122) fue uno de los primeros autores en utilizar animales para estudiar la osteoporosis. Hace ya 30 años, observó menor cantidad de calcio por unidad de volumen en las ratas ovariectomizadas con respecto al grupo control.

Realizando una revisión bibliográfica de la literatura, hemos clasificado los modelos de osteoporosis en dos grupos principales: aquellos con *predominio de reabsorción ósea* (ovariectomía, inmovilización de miembros, restricción de calcio o empleo de hormonas) y otro grupo donde predomina el *déficit de formación ósea* (ratas seniles y administración de corticoides) (123).

Modelos con predominio de reabsorción ósea

Caracterizados por altos niveles de remodelado y pérdida ósea acelerada. Estos modelos procuran estudiar las células responsables de la reabsorción ósea.

Ovariectomía (Ovx): La ovx en ratas es el modelo más usado para la investigación de la pérdida ósea trabecular secundaria a una deficiencia estrogénica. Es el modelo admitido internacionalmente ya que las áreas de mayor pérdida ósea son aquellas ricas en hueso trabecular, tales como vértebras y metáfisis de huesos largos (tibia y fémur). El grado de pérdida ósea depende de la edad en la que es realizada la ovx, siendo más intenso en animales jóvenes, comparado con animales viejos. La pérdida de cortical es mínima porque el crecimiento perióstico compensa el aumento de reabsorción endóstico. Por lo tanto la aplicación de este modelo para estudiar el hueso cortical tiene severas

limitaciones, que tienen que ser tomadas en cuenta en la interpretación de resultados (124).

Se ha observado que la ovx en cabras desarrolla una osteopenia transitoria. Esto puede ser explicado porque las cabras presentan ciclos hormonales ováricos mucho más largos que en los humanos, siendo el tejido óseo de estos animales menos estrógeno-dependiente. Sin embargo, la cabra es un excelente modelo para estudios de remodelación trabecular (123).

La mayoría de los estudios también han demostrado una disminución de la masa ósea a los seis meses de la ovx en ovejas (123).

En cerdos se han realizado muy pocos estudios; Mosekilde (125) tras ovx con restricción de calcio, observó disminución de BMD (densidad de masa ósea) vertebral, comparándolo con un grupo control.

El conejo debido a su ciclo de remodelado óseo mucho más rápido que en otros mamíferos mayores como perros y primates (126), es un modelo cada vez más utilizado para estudios de osteoporosis en vez de los antiguos modelos de restricción de calcio y de osteoporosis inducida por esteroides (127,128).

Restricción de calcio: La restricción de calcio, a diferencia de la ovx, induce mayor pérdida ósea cortical que trabecular; la reabsorción cortical endóstica está incrementada y el aumento de aposición perióstica reducida. Sin embargo en un reciente estudio en ratas se observó un aumento de hueso trabecular cuando los animales fueron sometidos a restricción de calcio y los autores especulan un posible efecto anabólico, debido a un hiperparatiroidismo secundario a hipocalcemia (129).

Inmovilización: Puede realizarse a través de tenotomía, resección de nervios o inmovilización de miembros. Así como en la restricción de calcio, observamos en este modelo pérdida de la cortical en roedores, por la disminución perióstica y aumento de la remodelación endóstica. Consecuentemente los huesos de estos animales presentan un menor diámetro cortical que en los animales sometidos a ovariectomía. Así pues, por estos motivos, la inmovilización de los roedores puede ser un modelo más apropiado de

osteopenia-osteoporosis que el modelo de ovariectomía, porque en contraposición al aumento de reabsorción ósea trabecular y endocortical (como sucede en los ovariectomizados), hay un menor grado de formación ósea en todos los huesos (130).

Administración de hormona tiroidea: Gouveia estudió el efecto de la administración de hormona tiroidea, en la masa ósea de ratas Wistar, observando una disminución de la misma cuando era administrada en altas dosis, utilizando para la evaluación de sus resultados métodos de histomorfometría y densitometría ósea (131).

Modelos donde predomina el déficit de formación ósea

Se caracterizan por bajo remodelado óseo, debido a un menor nivel de formación óseo. Este tipo de estudios se destinan principalmente al estudio de drogas que estimulan la formación ósea e investigación de la osteoporosis senil.

Ratas seniles (> 24meses): Se utilizan para ello reproductoras de desecho, son ratas reproductoras y se venden ya seniles.

Roedores de acelerada senescencia (SAM): Estudios realizados por Matsushita y cols. (132), demostraron que una raza de roedores de acelerada senescencia (SAM), desarrollaba picos de masa ósea más bajos que los controles.

Administración de glucocorticoides: También han sido usados en ratas (133), ovejas (134), cabras (135) y conejos (127,136), induciendo pérdida de masa ósea.

3.1.3.6. Fármacos empleados en el tratamiento de la osteoporosis

En la actualidad los fármacos comercializados son antiresortivos, es decir lo que hacen es frenar la pérdida ósea y aumentar secundariamente la masa ósea.

Bifosfonatos: Son compuestos sintéticos análogos al pirofosfato, potentes inhibidores de la reabsorción ósea. Existen dos grupos farmacológicos: los nitrogenados (alendronato y risedronato) y los pirofosfatos (etidronato) con diferentes vías metabólicas de actuación que todavía están en estudio. El etidronato (Disfofen[®]) debe darse de forma discontinua para evitar trastornos de la mineralización, mientras que el alendronato (Fosamax[®]) y el risedronato (Actonel[®]), a pesar de tener una mayor potencia, no producen trastornos de la mineralización y por tanto pueden darse de forma continua. Diversos estudios han observado con estos tratamientos una reducción significativa de fracturas vertebrales y de cuello de fémur. (137,138,139).

Calcitonina (CT): Es una hormona polipeptídica que inhibe la actividad resortiva de los osteoclastos. Posee un efecto analgésico central (CT de salmón en forma inyectada o inhalada) aliviando el dolor de las fracturas. Se encuentra en muchas especies pero las más utilizadas por su mayor potencia son la CT de salmón y la elcaltonina. Estudios retrospectivos sugieren un efecto protector de la calcitonina sobre el riesgo de fractura de cuello de fémur (140). No presenta efectos secundarios relevantes.

SERMS: Son moduladores selectivos de los receptores estrogénicos y dentro de este grupo esta incluido el tamoxifeno y el raloxifeno. El raloxifeno, a diferencia del tamoxifeno es agonista de los receptores beta-estrogénicos (hueso y aparato cardiovascular) y antagonista de los receptores alfa-estrogénicos (mama y útero). No es útil para la sintomatología menopáusica. El tamoxifeno también aumenta la masa ósea pero aumenta el riesgo de neoplasia de útero.

Terapia Hormonal Sustitutiva con Estrógenos (THS): Los estrógenos inhiben la reabsorción y turnover óseo con independencia de la vía utilizada, pero sus efectos sólo persisten mientras dura el tratamiento (5 años después de dejar el tratamiento, la DMO es similar a la que nunca hizo tratamiento) (141). En el Study of Osteoporotic Fractures

se observó que la pérdida de masa ósea aumentaba con la edad y que en edades de más de 70 años la TSH no frenaba la pérdida de DMO (141)

Calcio: El calcio es un inhibidor del remodelado óseo dependiente de la PTH. Si la ingestión de calcio es inadecuada el calcio del esqueleto se moviliza para mantener la calcemia. No están bien establecidos los requerimientos diarios, pero los expertos aconsejan alrededor de 1000 mg/día en los adultos y de 1200-1500 mg/día en la menopausia (142).

Vitamina D: Actúa sobre los osteoblastos regulando la mineralización y disminuye la síntesis y la secreción de PTH (hormona que aumenta la reabsorción del hueso, sobre todo cortical). Diversos estudios han demostrado que las mujeres con fractura de cuello de fémur presentaban niveles más bajos de 25(OH)D₃ que las no fracturadas (143). En ensayos clínicos se ha demostrado que 800 UI de vitamina D+1,2 mg de calcio reducían el riesgo de fractura de cadera en pacientes ancianos con déficit de vitamina D (144).

3.2. REGENERACIÓN ÓSEA

Cuando un tejido del cuerpo humano sufre un daño estructural, pueden ocurrir dos fenómenos; puede ser que el tejido sufra un proceso de *reparación*, en donde se produce la restauración de dicho tejido sin que éste conserve su arquitectura original ni tampoco su función o puede experimentar un fenómeno de *regeneración* originándose un nuevo tejido que posee todas las propiedades indistinguibles del tejido original, es decir, se produce la *restitutio ad integrum*. El problema que presenta el tejido cicatricial (*reparación*) es que no recupera las propiedades ni la función del tejido original, motivo por el cual, la *regeneración* es el objetivo terapéutico una vez que se produce daño tisular.

Las estrategias de que disponemos para conseguir la regeneración tisular se basan en la utilización de biomateriales artificiales o naturales y proteínas que aporten las señales estimuladoras que desencadenen los acontecimientos necesarios para la regeneración. La médula ósea es una fuente de células precursoras con capacidad de diferenciación en distintos tipos celulares: osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, mioblastos y adipocitos. Se ha demostrado la importancia de los factores de crecimiento y de las proteínas morfogenéticas (BMPs) en los procesos de proliferación, diferenciación y migración celular.

Existen tres mecanismos relacionados con el éxito en la regeneración ósea, la osteogénesis, la osteoinducción y la osteoconducción.

Osteogénesis: Es el proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo. Los osteoblastos vivos son trasladados desde otras zonas del organismo hacia el lugar donde se necesitan. Este mecanismo es el que se produce en los injertos de hueso autólogo, en donde se establece una actividad de remodelado, que simultáneamente lleva a la reabsorción del material injertado y el reemplazo por hueso neoformado, para llegar a conseguir la incorporación total de injerto.

Osteoinducción: Es el proceso de formación de hueso en tejidos donde originalmente no existe merced a la liberación de proteínas osteoinductivas que favorecen la diferenciación celular (BMPs).

Osteoconducción: Consiste en la creación de un andamiaje o matriz física apropiada para la deposición de hueso nuevo.

La demanda de tratamientos implantológicos en pacientes que han permanecido edéntulos muchos años, cada vez es mayor, de forma que estos maxilares permanecen sin estímulo funcional mucho tiempo y se desencadena una atrofia ósea que complica la rehabilitación con implantes, atendiendo a la máxima “donde no hay hueso, no hay implantes”. La regeneración ósea trata de dar solución a estos problemas mediante procedimientos que pretenden crear hueso donde no lo hay y las últimas vías de investigación concentran el esfuerzo en modificar el soporte óseo, tanto en calidad como en cantidad, allí donde la calidad ósea es deficiente o su distribución es irregular.

3.2.1 Terapéuticas de regeneración ósea

Regeneración ósea guiada: Se basa en que los distintos tejidos se regeneran a diferente velocidad. Así el tejido conectivo se regenera más rápidamente que el tejido óseo, de manera que cuando se produce un defecto óseo, llegan primero las células del tejido conectivo de revestimiento, impidiendo de este modo que las células óseas regeneren por completo el defecto. La regeneración ósea guiada trata de evitar esta invasión celular y de inducir la formación ósea mediante la utilización de barreras. El mecanismo consiste en la creación de una barrera física para que la revascularización del defecto provenga del propio tejido óseo e impida la llegada de capilares del conectivo de zonas adyacentes, ya que se produce un aislamiento del compartimento óseo, favoreciendo la regeneración ósea “guiada”. Los primeros estudios que demostraron este fenómeno fueron presentados por Nyman y Gottlow (145). Los dispositivos de barrera o membranas pueden ser de diferentes materiales y formas, utilizando unas u otras en función del tipo de defecto que se quiera regenerar. Básicamente existen dos tipos de membranas: reabsorbibles y no reabsorbibles (tabla VIII).

No Reabsorbibles	<ul style="list-style-type: none">• PTFE (politetrafluoretileno expandido)• PTFE con refuerzo de titanio• Micromallas de titanio
Reabsorbibles	<ul style="list-style-type: none">• Colágeno• Ácido poliláctico y poliglicólico• Duramadre

Tabla VIII. Tipos de membranas usadas en regeneración ósea.

Injertos óseos: Entre los medios para mejorar el sustrato óseo destacan los injertos, que se definen como “partes de hueso vivo no sujetas al cuerpo que sirven para cubrir, rellenar, conectar o dar soporte a otras partes del cuerpo lesionadas voluntaria o involuntariamente” (146). Desde una perspectiva de crecimiento óseo exclusivamente el mejor injerto es el de hueso autólogo, por sus propiedades, que engloba los tres mecanismos involucrados en la regeneración ósea ideal: osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, ya que proporciona células óseas, proteínas osteoinducivas como factores de crecimiento y BMPs así como una importante matriz de soporte. La actividad osteogénica, está dominada por las células óseas, mediante la formación de tejido osteoide, sin embargo no sólo las células óseas injertadas contribuyen a la formación de hueso. El injerto también sufre una remodelación que hace que durante la fase de reabsorción se liberen factores de crecimiento y BMPs procedentes de la matriz favoreciendo la osteoinducción. La estructura ósea del injerto, actúa como matriz del hueso neoformado, permitiendo el efecto osteoconductor.

El hueso autólogo se puede obtener de varias localizaciones, dependiendo de la cantidad y calidad del hueso que se quiera injertar: (tabla IX)

Extraoral	<ul style="list-style-type: none">• Cresta iliaca• Calota• Tibia
Intraoral	<ul style="list-style-type: none">• Mentón• Rama ascendente• Tuberosidad

Tabla IX. Tipos de injertos autógenos.

La reabsorción es mayor con hueso esponjoso, pero la incorporación es más rápida que con hueso cortical. La reabsorción que tiene lugar tras el injerto es menor con hueso de mentón, rama ascendente o de calota (origen intramembranoso) que con el obtenido de la cresta iliaca (origen endocondral). Además recientemente se ha comprobado que los injertos de origen membranoso poseen más factores de crecimiento (IGF y TGF- β) que los de origen endocondral (147).

Una alternativa al hueso autólogo son los aloinjertos, procedentes de otro individuo de la misma especie y suministrado a través de bancos de tejidos. Este procedimiento muy extendido en EEUU, no parece tener el mismo éxito en nuestro país. Se emplea hueso liofilizado desmineralizado, (lo que se conoce en inglés con las siglas DFBA). Este material se ha usado con éxito en numerosas situaciones clínicas (148,149); presenta la ventaja de la amplia disponibilidad de material y que no hay necesidad de un segundo campo quirúrgico. Sin embargo existe controversia respecto a la capacidad osteoinductiva de estos materiales que parece influenciada tanto por la técnica de procesado utilizada en los diferentes bancos de hueso, como por la edad del donante, siendo el hueso de donantes jóvenes el que mejores propiedades osteoinductivas presenta. La utilización de tejidos procedentes de otros individuos tampoco está libre de controversia (150).

Osteodistracción: A pesar de su utilización hace bastantes años en traumatología a partir de los trabajos de Ilizarov, su incorporación al ámbito de la Cirugía Bucal es relativamente reciente. Su filosofía es provocar una fractura e ir separando los dos fragmentos con unos instrumentos que se denominan osteodistractores. Estos constan de dos microplacas, que se colocan en los fragmentos fracturados y que se activan con un tornillo, que tiene como finalidad separar las dos partes. De este modo, mediante la activación del tornillo, se separan los dos fragmentos óseos previamente fracturados estirando el coágulo de fibrina que se forma entre ellos y creando progresivamente un puente óseo entre ambos fragmentos (151). Parece que la osteointegración de los implantes en el hueso distraído ocurre de la misma forma que en el hueso natural, siendo los tiempos de carga iguales que en la implantología tradicional (152).

Biomateriales: La finalidad de éstos es favorecer la osteoconducción, es decir servir de estructura o molde para la deposición de hueso nuevo. Los sustitutos del hueso incluyen material óseo poroso bovino, cerámicas de fosfato cálcico, polímeros de sustitución de tejido duro y cerámicas de cristal bioactivo.

Los biomateriales son sustancias sintéticas empleadas para sustituir o incrementar los tejidos biológicos. La European Society of Biomaterials define los biomateriales como “materiales no vitales que se utilizan en aplicaciones médicas con la finalidad de obtener una interacción con un determinado sistema biológico” (153). Las características más importantes que debe reunir un biomaterial están recogidas en la tabla X (154).

- Compatibilidad biológica
- Osteoconductividad
- Radioopacidad
- Facilidad de uso y manipulación
- Rechazo del crecimiento de los patógenos orales
- Hidrofilia
- Posibilidad de suministro en partículas o molde
- Actividad eléctrica de superficie
- Microporosidad
- Ausencia de acción alérgica
- Resistencia elevada a la compresión
- Precio económico

Tabla X. Características idóneas de un biomaterial.

Están disponibles en gran variedad de texturas, tamaños y formas. La proporción de la reabsorción varía y depende de la estructura química del material, porosidad y tamaño de la partícula. En general cuando las partículas son grandes tardan más en reabsorberse y permanecen más tiempo en el lugar donde se han colocado y la reabsorción es más rápida cuanto menor sea el tamaño de las partículas. Cuanto más poroso sea el material, más capacidad osteoconductiva proporciona para el crecimiento de hueso nuevo, pero también se reabsorberá más rápidamente.

Una de las características físicas en la que más se investiga es en el tamaño y la porosidad de los biomateriales, en función de la cual se establece la capacidad de reabsorción de éstos y su posterior sustitución por hueso neoformado. El tamaño mínimo de los poros para permitir el crecimiento óseo es de 100 micras, ya que los menores impiden el paso de las células óseas (155), empleándose normalmente rangos de entre 100 y 500 micras que permiten el crecimiento óseo tanto en el interior de los poros, como alrededor de los mismos. El significado clínico de estas características físicas, es permitir un crecimiento más extenso y una mayor superficie de unión entre el hueso neoformado y el biomaterial (156).

Destacan desde hace años la hidroxiapatita (HA) y más recientemente el fosfato tricálcico, los biovidrios y los polímeros, en un intento de avanzar en el tratamiento de los biomateriales a favor de una mejor interacción con los tejidos. Actualmente no nos conformamos con que un material sea biocompatible, sino que perseguimos que sea bioactivo, esto es, de reaccionar con el huésped para favorecer las respuestas tisulares.

Es probable que la **hidroxiapatita** (HA) sea el material más investigado y examinado hasta la fecha como sustituto óseo, no en vano, contiene una proporción de calcio-fosfato de 1,67, idéntica al mineral óseo y con un módulo de elasticidad parecido. Aunque existen diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre la HA autógena y la HA cerámica, esta forma mineral es el elemento inorgánico principal del sistema esquelético, siendo éste el principal argumento que justifica su utilización. Se puede obtener sintéticamente o derivar de materiales naturales (hueso, algas o corales) (157). Una clasificación se presenta en la tabla XI.

ORIGEN	TIPOS	NOMBRE COMERCIAL	REABSORBIBLES
SINTÉTICAS	Densas	Osteograft	NO
		Periograft	NO
		Bioapatite	NO
	Porosas	Osteogen	SI
NATURALES	Coralina	Interpore	Lentamente
	Ficógena	Algipore	Lentamente
	Bovina	Bio-oss , Laddec	Lentamente
	Equina	Biogenmix	Lentamente
	Porcina	Osteobiol	Lentamente
COMBINADAS	Bovino-Colágeno	Bio-oss Collagen	Lentamente

Tabla XI. Tipos de hidroxiapatitas.

HA Sintéticas: Son una forma del fosfato de calcio cerámico, no son ni osteogénicos ni osteoinductivos, es decir no producen la formación de hueso en sitios ectópicos, sin embargo, cuando se aplica en áreas en las que existe hueso, sirve como matriz para la formación de hueso nuevo, considerándose un material con propiedades osteoconductoras (158,159,160,161,162,163,164,165).

HA Naturales:

Coralíferas: Se utiliza como material un coral formador de arrecifes del género Porites, que presenta un esqueleto formado por acúmulos de cristales de aragonita. La porosidad de los cristales de aproximadamente 230 micras y una macroestructura semejante a la del hueso cortical han hecho de este coral un adecuado material de injerto, una vez que

se realiza la conversión de los cristales de aragonita (CaCO_3) en hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (161).

Ficógenas: Se utilizan algunas especies de algas calcificadas aprovechando la similitud de su arquitectura natural con la del hueso. Después de quitar todas las partes orgánicas y de la transformación del carbonato en HA, el andamio inorgánico resultante ofrece una superficie y estructura similar al hueso (Algipore[®]). No existen suficientes estudios que avalen su uso como material de injerto (166).

Bovinas: Se trata de mineral óseo derivado de ganado bovino. Las más conocidas son OsteoGraft/N[®] (Cera Med. Cor., Denver, CO) y el Bio-oss[®] (Geistlich Söhne AG, Wolhusen, Switzerland), éste último posiblemente sea el biomaterial más estudiado como sustituto óseo en los últimos años.

Bio-Oss[®]: Durante los últimos años los sustitutos óseos de origen natural han experimentado un auge debido a las ventajas que presenta su gran similitud con el hueso humano. Es conocido que la respuesta biológica de un tejido frente a un material está fuertemente influenciada tanto por la superficie y topografía de su estructura como por sus propiedades químicas (176). De este modo la adhesión celular, la cicatrización y regeneración tisular puede verse favorecida por estos biomateriales naturales, sirviendo como matriz para la nueva formación de hueso. Los últimos avances en ingeniería tisular apuestan por los materiales naturales como óptima estructura para el cultivo de células y tejidos.

El hueso autógeno está considerado como el sustituto óseo ideal, sin embargo, el hueso disponible en la cavidad oral es limitado y la necesidad de tomar injertos de las zonas donantes suponen un incremento de la morbilidad. Las propiedades osteoconductoras y la lenta reabsorción que ofrecen sustitutos óseos naturales como el Bio-Oss[®] han sido utilizados en un intento de superar las limitaciones de los injertos de hueso autógeno.

Propiedades fisico-químicas: Se ha demostrado que el Bio-Oss[®] es altamente osteoconductor (177). Probablemente la razón de este comportamiento es su gran

similitud con el hueso humano, conteniendo una proporción de calcio-fosfato de 1,67, idéntica al mineral óseo y con un módulo de elasticidad parecido. El hueso está compuesto por un andamiaje de colágeno y proteínas que sirve de matriz para la deposición de la fase mineral. Durante el proceso de fabricación del Bio-Oss[®], esta matriz orgánica es eliminada, sin alterar los microtúneles existentes entre los cristales de apatita, resultando una matriz mineral remanente con cristales de aproximadamente 150 micras que presenta propiedades químicas, morfológicas y ultraestructurales muy parecidas al hueso humano (figura 8) (178,179).

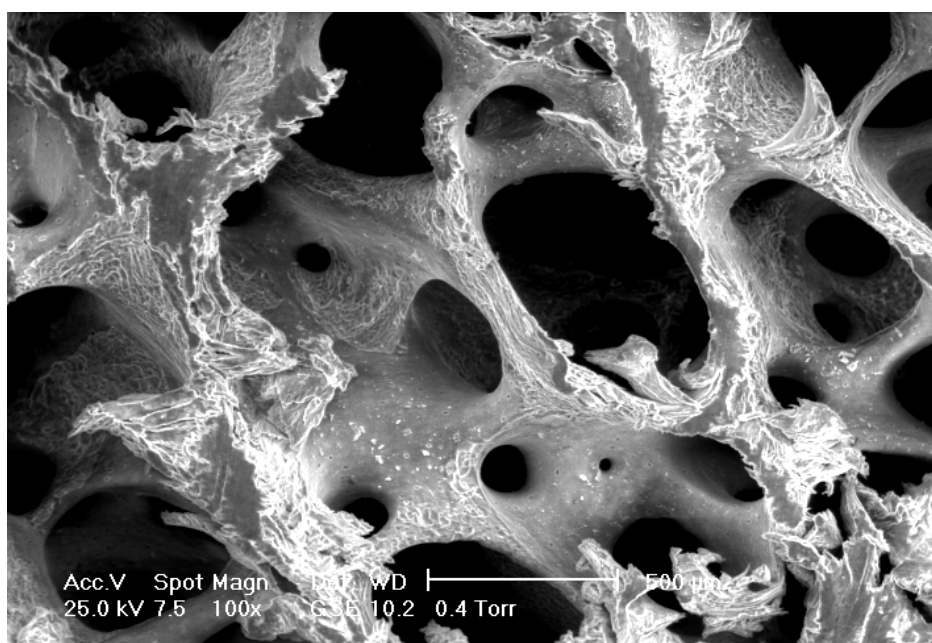


Fig 8 . Detalle de la porosidad del Bio-Oss. Microscopia Electrónica Barrido (ESEM)

La importancia de la topografía de superficie en el anclaje celular ha sido muy estudiada en los últimos años, básicamente estos estudios se han aplicado en el campo de la implantología para mejorar los mecanismos de osteogénesis de contacto (404). De este modo se ha demostrado que la osteointegración en superficies mecanizadas es menor que sobre superficies rugosas (179,180,181,182). El Bio-Oss[®] presenta una topografía rugosa que favorece el anclaje osteoblástico, la proliferación y síntesis de matriz ósea sobre su superficie (183,184).

Otro factor importante para la respuesta tisular es el *área de superficie interna*, que mide el espacio disponible existente en un material, para el crecimiento a su través de vasos sanguíneos y hueso, lo que hace que el área de esta superficie interna sea

probablemente otro de los factores fuertemente vinculados en la integración ósea de un material. Weibrich y cols (185) compararon el área de superficie interna de 12 materiales diferentes usados como sustitutos óseos y encontraron que el Bio-Oss[®] presentaba un área de superficie interna extraordinaria (79,7 m²/g), en contraste con el resto de materiales analizados que presentaron valores de hasta 5 veces menores.

A pesar de sus buenas propiedades fisico-químicas el origen bovino de este biomaterial y la posibilidad de transmitir enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob ponen en tela de juicio su seguridad, aunque existen autores que defienden la ausencia de proteínas en el Bio-Oss[®] (186,187,188,189).

Características biológicas: La adsorción de sangre y proteínas séricas entre los microporos del Bio-Oss[®], es lo primero que sucede tras la colocación del material en el área que se pretende regenerar. Entre estas proteínas, existen unas, que actúan como receptores celulares y que se conocen como integrinas, habitualmente involucradas en la adhesión celular (190). La extensión de material en contacto con estas proteínas e integrinas adsorbidas, así como su cantidad y el área de superficie del material son probablemente factores clave para el anclaje celular y la integración tisular del material. El Bio-Oss[®] ofrece un área de superficie interna extraordinariamente grande y un numeroso sistema de microporos interconectados, en el cual pueden penetrar gran cantidad de proteínas y nutrientes que modularán la respuesta tisular.

Como resultado de estas características biológicas, el Bio-Oss ha demostrado ser un material osteoconductor excelente y esta propiedad ha sido ampliamente documentada en la literatura (191,192,193,194). La microestructura natural del Bio-Oss, invadida en un inicio por abundantes proteínas involucradas en la regeneración tisular, ofrece un andamiaje excelente para la migración de células sanguíneas y osteoblastos procedentes de los márgenes del defecto. Esto permite la formación de capilares sanguíneos a través de la extensa red de microporos y a la formación de matriz ósea por osteoblastos. La rápida integración ósea del Bio-Oss, se ha demostrado en muchos estudios (194,195), posiblemente favorecida por la adsorción de elementos procedentes del suero que actúan como señal química para la migración de células óseas y sanguíneas.

El anclaje celular y la neoformación ósea en el Bio-Oss también ha sido demostrado en cultivos celulares *in vitro* en tres dimensiones en estudios mediante Microscopía Electrónica de Barrido (183). A las 2 semanas se pudo observar la formación de fibrillas de colágeno maduras por parte de los osteoblastos. Esto demuestra la rápida actividad de estas células en contacto con el Bio-Oss, así como la capacidad de este material para crear una matriz de anclaje para los osteoblastos. Transcurridas 6 semanas las células óseas habían formado una extensa matriz extracelular compuesta por fibrillas de colágeno en ausencia de la estructura de Bio-Oss (183).

La microestructura y composición química del Bio-Oss, parece jugar un papel fundamental a la hora de integrarse de un modo natural en el proceso de remodelación ósea, a diferencia de otros materiales sintéticos que sufren su degradación por medio de mecanismos químicos. Varios estudios han demostrado actividad osteoclástica frente al Bio-Oss, así como una reducción en la cantidad de Bio-Oss transcurridos 6 meses (193,196).

Como su reabsorción es lenta, la matriz de Bio-Oss sirve como componente estable para la nueva formación de hueso y previene la reabsorción prematura de injertos. Esta característica hace que los volúmenes de hueso regenerado sean mucho más estables con Bio-Oss o mezcla de Bio-Oss con hueso autógeno, comparados con injertos de hueso autógeno puro (196,197).

Equinas y Porcinas: Debido a la aparición de la enfermedad de las vacas locas o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, a nivel europeo está empezando a sustituirse las HA bovinas por equinas y porcinas.

En un principio, para conseguir un aumento del reborde alveolar edéntulo, se emplearon HA densas, sintéticas, no reabsorbibles, bien en forma de bloques o en partículas porosas. Pero se observó que no producían osteogénesis y que se rodeaban de tejido fibroso, es decir, se comportaban como un secuestro de cerámica bien tolerado (162). Posteriormente se emplearon HA porosas, donde las dimensiones de los poros permitían el crecimiento a su través como la coralina o la ficógena y actualmente se

emplean mayoritariamente HA de origen bovino con una porosidad similar a la del hueso humano. El uso de HA de origen bovino mezclado con hueso autógeno está recomendado, puesto que a la matriz para la neoformación ósea se le suma la aportación de factores de crecimiento y proteínas para la osteogénesis (167). Además esta mezcla acelera el proceso de sustitución progresiva por hueso (161).

El **fosfato tricálcico** es otra cerámica bioactiva que promueve la formación ósea mediante el intercambio de calcio y fósforo. Es otro componente del hueso, al igual que la HA. La HA contiene una proporción de calcio-fosfato de 1,67, idéntica al mineral óseo, a diferencia del fosfato tricálcico, cuya proporción es de 1,51, lo que hace suponer que tenga una aceptación e integración biológica diferente a la HA. El fosfato tricálcico es osteoconductor y proporciona una base adecuada para la deposición de nuevo hueso (Cerasorb[®]). Actualmente es un material muy utilizado en los países anglosajones.

Los **biovidrios** o partículas de vidrio cerámico (Perioglass[®], Biogran[®]) fueron descubiertos por L. Hench en 1970 y su uso se ha generalizado desde los años ochenta en ortopedia, cirugía plástica y otorrinolaringología y desde 1994, también en odontología. Su mayor ventaja es la de ser integrado por los tejidos en lugar de ser aislado por el tejido fibroso. El vidrio bioactivo está formado en un 45% por sílice (SiO₂) pero además contiene sales de sodio, calcio y fosfatos. Su mecanismo de acción consiste en unirse al hueso y a los tejidos blandos, a la par que promueve la formación de una capa de hidroxiapatita. Es decir, se produce unión entre el vidrio y el hueso, llamada *fijación bioactiva*, que puede definirse como “unión de un implante a los tejidos mediante la formación de una capa de HA biológicamente activa”. Cuando un vidrio bioactivo se pone en contacto con fluidos orgánicos se originan tres reacciones: difusión, disolución y precipitación, por las que el sodio se separa del vidrio, se disuelve el óxido de silicio y se forma un gel de sílice, cargado negativamente, que va a ser el lugar de nucleación para la formación de carbonato y fosfato cálcico. Sobre éste se va formando hidroxycarbonato de apatita. Además el sílice soluble activa la adsorción de factores de crecimiento, fundamentalmente TGF-β₁, sobre el gel de sílice y los cristales de hidroxycarbonato de apatita, con lo que se produce una rápida proliferación de osteoblastos, que sintetizarán matriz osteoide y posteriormente se mineralizará, permitiendo el crecimiento de hueso (168) (169).

Los **polímeros** llevan siendo empleados en ortopedia desde los años treinta. Entre sus múltiples utilidades destacan: la fabricación de lentes de contacto, válvulas cardíacas protésicas, prótesis de cabeza de fémur y cementos óseos ortopédicos. Dentro de este tipo de materiales poliméricos hay que destacar el polímero sustituto de tejido duro (Hard Tissue Replacement) (H.T.R.[®]) (Sciences División Corporation, Norwalk, Conn), compuesto por un núcleo de polimetilmetacrilato (PMMA), que es hidrófobo y una capa externa de polihidroximetilmetacrilato (PHEMA) e hidróxido de calcio, que son hidrófilos y proporciona la carga negativa lo que favorece la formación ósea (170) e impide la colonización bacteriana. Es microporoso y no reabsorbible.

Distintos autores han examinado la respuesta tisular y la interfase entre hueso y HTR en animales de experimentación. (171,172). La primera reacción observada en la interfase hueso/HTR, es que el material es bien aceptado a juzgar por el estado terminal de la reacción inflamatoria de los tejidos adyacentes, en los que se puede observar varias células procedentes del sistema vascular, fundamentalmente macrófagos, en contacto con el HTR, como respuesta normal del organismo ante la presencia de biomateriales. En una segunda fase aparece otra población de células en la interfase de unión, que morfológicamente no se corresponden con osteoblastos, tratándose presumiblemente de fibroblastos y células pluripotenciales (stem cell), con capacidad de transformarse en osteoblastos.

Se ha utilizado con éxito en el relleno de defectos óseos y periodontales y también en técnicas de cirugía preprotésica de aumento de reborde alveolar (173) (174) (Ashnman 1988, Yukna 1990).

El potencial osteoconductor del HTR ha sido comparado con el de la hidroxiapatita, en ensayos experimentales, aunque los resultados mostraron que la hidroxiapatita tenía un potencial de estimulación ósea mayor que la resina de metacrilato, siendo preciso disponer de estudios a largo plazo que investiguen la respuesta ósea frente a este biomaterial (162). Presenta la desventaja de no ser un biomaterial reabsorbible, ya que no puede disolverse por los osteoclastos y por lo tanto no se produce la sustitución progresiva por hueso nuevo.

Existen otros polímeros reabsorbibles basados en compuestos de ácido láctico y ácido glicólico (Fisiograft®). Se comercializan en diversas formas y tamaños y se han utilizado sobre todo en zonas de extracción del tercer molar para mantener el coágulo. Estudios con compuestos de ácido poliláctico y poliglicólico en forma granulada, han demostrado la presencia de una leve reacción inflamatoria en el tejido circundante y una fina cápsula conectiva alrededor de las partículas del material, que precede a una reabsorción progresiva del biomaterial por hueso regenerado, aunque de peor calidad que el hueso maduro (175).

3.2.2. Factores de crecimiento

Mecanismo de acción de los factores de crecimiento

Los factores de crecimiento, son generalmente, proteínas pequeñas que las células secretan en el espacio intercelular y que desempeñan un papel fundamental como mediador biológico en la regulación de la migración, diferenciación y proliferación celular. Se unen a receptores específicos de la superficie de las células para posteriormente activar un segundo mensajero, que es una proteína tirosin-quinasa y que inducirá una determinada respuesta en el núcleo.

La estimulación celular se realiza bien por un sistema autocrino, es decir, las células producen y responden al mediador biológico o por un sistema paracrino en el que la célula que produce el factor se encuentra en las proximidades de las células a las que afecta. La regulación de los procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis se realiza mediante señales generalmente externas a la propia célula que las ejecuta. Son los factores o mensajeros primarios, producidos por las células secretoras, que interaccionan con receptores específicos en las células efectoras. Las células se pueden comunicar por un sistema endocrino, donde la célula secretora está distante de la efectora, como ocurre en la señalización hormonal.

La transducción de señales es el proceso mediante el cual las células perciben cambios en su ambiente y que resulta en una reacción celular (figura 9). El primer paso para la transducción de señales es el reconocimiento de las señales extracelulares mediante los receptores de membrana plasmática. Posteriormente se activa una serie de

cascadas intracelulares (vías de transducción o señalización intracelular) que transmiten la señal al citoplasma y al núcleo, donde se activa la transcripción de genes en respuesta a las señales recibidas (212,213).

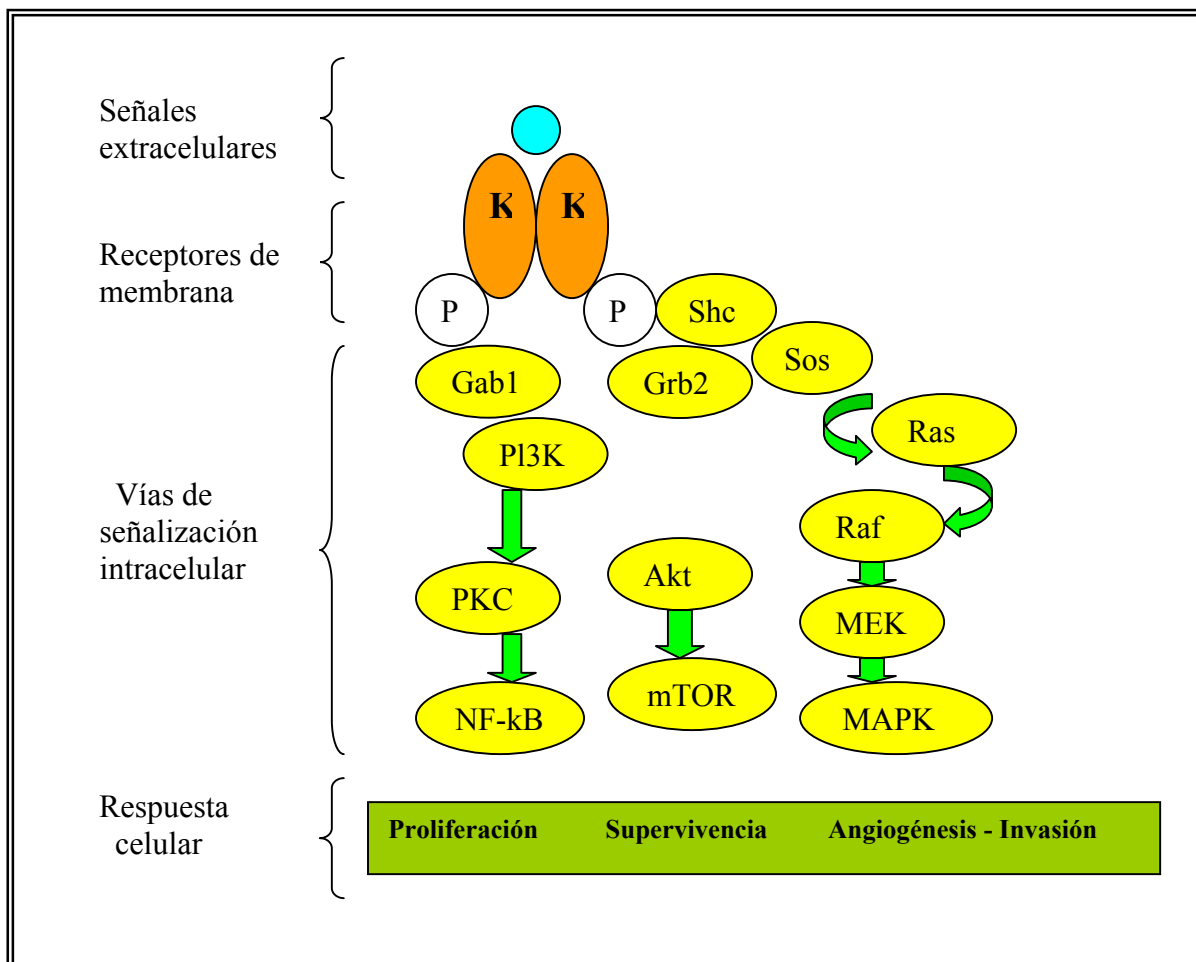


Fig 9. Principales vías de señalización intracelular.

El receptor consta de un dominio extracelular de unión al ligando, un segmento transmembrana helicoidal y una porción citoplásmica (figura 10). La parte extracelular contiene dos dominios ricos en cisteína a los que puede unirse una serie de factores de crecimiento. El segmento lipófilo central ancla el receptor en la membrana celular, y el dominio intracelular es una proteína tirosin-quinasa con un segmento carboxilo-terminal regulador que es un sitio de unión para los sustratos de la kinasa.

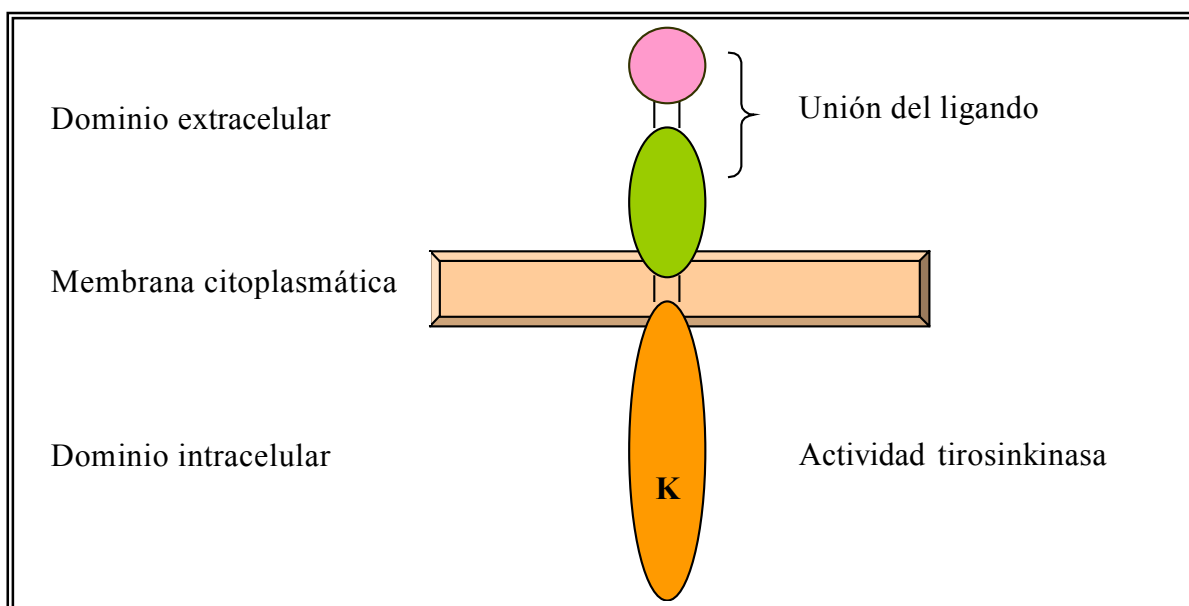


Figura 10. Dominios del receptor de la membrana plasmática.

Las interacciones entre las proteínas y el complejo receptor activado estimulan las proteínas ras y provocan el comienzo de una cascada de episodios de fosforilación y la activación de las kinasas MAP (proteínas activadas por mitógeno) (214). Las proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPK) transmiten la señal al núcleo a través del citoplasma.(214).

El núcleo es el destino final de todos estos mecanismos de señalización, donde modifican de manera específica la transcripción de diversos genes, cuya expresión conlleva, como respuesta final, un cambio en el comportamiento de la célula. Los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la transcripción génica son los destinatarios últimos del proceso de transmisión de señales.

El núcleo actúa como integrador de todas las señales que recibe, interpretando la respuesta adecuada. Esta regulación es la base de la vida misma, pues desde el momento de la fecundación y durante toda la ontogenia deben estar sincronizadas. En el organismo adulto, el balance entre señales de proliferación, diferenciación y muerte equilibra y ajusta el funcionamiento de todos los tejidos y órganos, garantiza la renovación adecuada de las células inservibles o dañadas, conforma la arquitectura de los tejidos y constituye la base de una respuesta adecuada a los agentes patógenos, regulando la respuesta inmune. Un elemento esencial del adecuado funcionamiento de órganos y tejidos es el equilibrio del número apropiado de células en proliferación y de

células especializadas, así como la eliminación de las células que ya no son necesarias o funcionalmente competentes, equilibrio que se logra mediante el triángulo de proliferación, diferenciación y apoptosis. Estos tres procesos mantienen en las células normales tanto circuitos de regulación positiva, o de activación, como circuitos de regulación negativa, o de inhibición (214).

Entre los tipos celulares productores de factores de crecimiento están los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y leucocitos, especialmente monocitos y macrófagos. Además existen lugares de almacenamiento, como son las plaquetas y el hueso.

Los factores de crecimiento con mayor importancia en la regeneración ósea se presentan en la tabla XII.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
IGF: Factor de crecimiento análogo a la insulina.
TGF- β : Factor de crecimiento transformante tipo β (entre los que se encuentran las BMPs)
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

Tabla XII. Factores de crecimiento con importancia en la regeneración ósea

Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF)

Se le denominó de esta manera por encontrarse por vez primera en los gránulos alfa de las plaquetas (205), aunque también puede encontrarse en otros tipos celulares como monocitos y fibroblastos (211), macrófagos, células endoteliales, células epiteliales y en la matriz ósea (215,216).

El PDGF es un polipéptido termoestable (100 grados centígrados) y catiónico, con un punto isoeléctrico muy básico de 10,2 (217) y tiene un peso molecular de 30.000 daltons (218,219). Tiene una estructura dimérica formada por dos cadenas de aminoácidos denominadas A y B. Las dos cadenas tienen una similitud del 60%. La cadena A está constituida por 121 aminoácidos mientras que la B está compuesta por 125

aminoácidos (217). Dos genes se encargan de la codificación del PDGF. La cadena A del péptido está codificada en el cromosoma 7 y la cadena B en el brazo largo del cromosoma 22 (215).

Se han encontrado tres formas (218,219): PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB. Existen dos receptores para el PDGF: el receptor PDGF α para PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB y el receptor PDGF β para PDGF-BB y PDGF-AB. La capacidad de ciertas estirpes celulares de interaccionar con los diferentes PDGF depende de la presencia en la membrana de estas células de receptores α ó β . Su actividad está mediada por una proteína tirosínquinasa como todos los factores de crecimiento.

Ambos receptores inducen respuesta mitogénica; y el receptor β a diferencia del α interviene en la estimulación quimiotáctica.

Piche y cols, en 1989, (220) demostraron que el PDGF estimulaba la proliferación de los fibroblastos del ligamento periodontal.

Zhang y cols, en 1991, (221) observaron que los osteoblastos poseían una gran cantidad de receptores de PDGF y respondían a la PDGF-AA y PDGF-BB, y que estos osteoblastos eran capaces de producir PDGF-AA pero no PDGF-BB.

Matsuda y cols, en 1992, (222) realizaron un estudio demostrando que el PDGF tiene un efecto mitogénico en los fibroblastos del ligamento periodontal, mostrando que los fibroblastos tenían una extraordinaria respuesta quimiotáctica hacia el PDGF. De la misma forma, se observó que el PDGF-BB estimuló la síntesis de colágeno y la proliferación y la quimiotaxis. Aunque los mejores resultados en las funciones quimiotácticas y mitogénicas se obtenían con la combinación de varios factores de crecimiento, siendo la combinación más efectiva el PDGF-BB/IGF-I.

Oates y cols, en 1993, (223) demostraron que los mayores estimuladores de la mitogénesis en las células del ligamento periodontal humano, eran el PDGF-BB y el PDGF-AA.

Dennison y cols, en 1994, (224) también encontraron que el PDGF estimulaba en mayor medida la proliferación de células del ligamento periodontal que la de los fibroblastos gingivales.

Boyan y cols, en 1994, (225) demostraron que aunque las tres formas del PDGF estimulaban las células del ligamento periodontal, el PDGF-BB era el más potente de los tres, seguido del PDGF-AB. El PDGF-AA era el menos efectivo de los tres.

Hock y Canalis (226) sugirieron en 1994 que el PDGF incrementaba la proliferación de las células óseas pero no favorecía la diferenciación osteoblástica.

Saygin en 1995, (227) observó que el PDGF incrementaba la producción de osteopontina, pero disminuía la producción de osteocalcina y sialoproteína en células óseas, y también reducía la actividad de fosfatasa alcalina y la mineralización ósea, particularmente bajo exposiciones prolongadas.

Nishimura y Bartold, en 1996, (228,229) estudiaron el efecto de estimulación de la migración y proliferación sobre fibroblastos del ligamento periodontal, observando que el PDGF incrementaba la migración de estas células de manera dosis-dependiente.

En 1998, Anderson (230) estudió los efectos del TGF- β y del PDGF sobre el crecimiento de fibroblastos gingivales humanos en un medio en presencia de suero bovino fetal (FBS) y en un medio en ausencia de suero. Las conclusiones a las que llegó fueron que en ambos medios la respuesta del PDGF-BB era dosis-dependiente por encima de 40 ng/ml, sin embargo se encontró la máxima respuesta en el medio con FBS a una concentración de 20 ng/ml; y por otro lado que el crecimiento de fibroblastos gingivales humanos, en un medio libre de suero, con aplicación de concentraciones de PDGF-BB de 20 ng/ml, fue equivalente al crecimiento obtenido en un medio con FBS sin adición de factores de crecimiento.

Los estudios *in vitro* realizados tanto sobre células de origen animal, como con células humanas arrojan resultados semejantes (222,229). Estos estudios parecen indicar que el PDGF podría contribuir al reclutamiento de células óseas durante la reparación y

remodelado, al ser depositado en la matriz ósea y liberándose posteriormente durante la degradación de la matriz.

Respecto a los estudios *in vivo* sobre la regeneración ósea y periodontal comenzaron en 1987 en ratas comprobando como podían inducir la formación de tejido de granulación (231). Posteriormente se realizaron estudios sobre otros modelos animales como los perros Beagle y monos Rhesus para comprender mejor el papel de los factores de crecimiento en los mecanismos de regeneración ósea y periodontal.

En 1989 Lynch, (232) realizó un estudio en perros Beagle, para comprobar la utilización de factores de crecimiento y observó que aumentaba la regeneración de los tejidos periodontales. En el estudio histológico se observó la neoformación de hueso alveolar, a las dos semanas de la aplicación local de PDGF/IGF-I, con diferencias estadísticamente significativas respecto de los controles. Toda la superficie de hueso nuevo se encontraba rodeada de una capa de células osteoblásticas continua. La capacidad para estimular la regeneración era debida a los efectos que tienen los factores de crecimiento sobre las células mesenquimales.

De nuevo Lynch, 1991, (233) realizó un estudio en perros Beagle observando que se incrementaba el metabolismo óseo a las cuatro semanas de la aplicación de PDGF/IGF-I. Se producía un incremento significativo de la altura y la densidad ósea, en comparación con los controles, en un periodo de tiempo de entre dos y cinco semanas.

Lynch también en 1991, (234) estudió la formación de hueso alrededor de implantes mediante la combinación de PDGF-BB/IGF-I a dosis de 4 µg. Los resultados del estudio indicaron que la aplicación *in vivo* de la combinación de estos factores de crecimiento promovía la regeneración del hueso alrededor del titanio durante las primeras fases de la cicatrización. A los siete días, los implantes a los que se aplicaron los factores de crecimiento, PDGF-BB/IGF-I, presentaban un porcentaje significativo de hueso en contacto con el implante (BIC, Bone Implant Contact) en comparación con los controles. El uso combinado de PDGF/IGF-I alrededor de los implantes podría acelerar y aumentar la osteointegración de los implantes, particularmente en lugares con densidad ósea deficiente.

En 1991, Sloan (235) hacía referencia a los posibles efectos beneficiosos, que podría tener la aplicación de factores de crecimiento alrededor de los implantes en huesos tipo IV, con una calidad ósea pobre en los que conseguir una estabilidad primaria de los implantes es más complicada.

Becker, en 1991, (236) proponía el uso de PDGF/IGF-I en combinación con membranas. Consideraba su utilización en situaciones de crestas estrechas que requerían un aumento en anchura, para la posterior colocación de implantes y en defectos óseos. Una de las ventajas es que la membrana podía mantener los factores de crecimiento en contacto íntimo con los implantes.

Rutherford, en 1992, (237,238) estudió la regeneración de tejidos periodontales en primates mediante la aplicación de factores de crecimiento y observó que con la aplicación de PDGF-BB/IGF-I inducía una significativa regeneración periodontal. Los factores de crecimiento eran capaces de inducir la regeneración de aproximadamente el 50% de los tejidos en un periodo de tiempo de 4 semanas.

En 1994, Wang y cols, (239) realizaron en perros Beagle defectos óseos experimentales, para valorar la regeneración producida por PDGF. Se realizaron tres grupos de estudio; el control en el que la terapia regenerativa sólo incluía membranas de PTFE-e, un segundo grupo utilizaba membrana de PTFE-e+PDGF y en un tercer grupo sólo se utilizó PDGF. Los resultados indicaron que el PDGF estimuló más la proliferación de fibroblastos respecto al grupo control, independientemente del uso combinado con membranas o sin ellas.

Cho y cols, en 1994, (240) concluyeron que el PDGF-BB es el estimulador más potente de la mitogénesis, seguido del PDGF-AA y del PDGF-AB. Como quimiotáctico el PDGF-BB es el doble de potente que el PDGF-AA para las células del tejido conectivo. El PDGF estimula células de origen mesenquimatoso como los fibroblastos, las células de la glia, células musculares lisas y células óseas.

Park y cols, realizaron en 1995, (241) un estudio en perros Beagle con el objetivo de comparar la regeneración tisular guiada (RTG) sobre defectos de furca tipo III horizontales creados artificialmente, con o sin el uso de PDGF-BB. Los animales

fueron sacrificados a las 8 y 11 semanas, encontrando una mayor formación ósea y del ligamento periodontal siendo estadísticamente significativa en las lesiones tratadas con terapia combinada de RTG+PDGF-BB. En el grupo experimental, se observó, que el nuevo hueso rellenaba el 80% del defecto a las 8 semanas y el 87% a las 11 semanas, siendo en el grupo control sensiblemente inferior (14% a las 8 semanas y 60% a las 11 semanas).

En 1995, Cho y cols, (242) realizaron un estudio en perros Beagle, para estudiar el efecto de RTG+PDGF-BB, llegando a la conclusión de que la terapia combinada, promovía la regeneración periodontal de manera más rápida y significativa, que cuando se usaban sólo membranas de PTFE-e.

Giannobile y cols, en 1994, (243) realizaron un estudio comparando los efectos de combinar PDGF/IGF-I, sobre perros Beagle y monos, para estimular la regeneración periodontal. En ambos grupos de animales se observó un aumento significativo en la regeneración periodontal respecto a los controles de ambos grupos.

En 1996, Gianobile y cols, (244) realizaron un nuevo estudio sobre monos estudiando la regeneración periodontal mediante el uso de PDGF aplicado individualmente y en terapia combinada de PDGF-BB+IGF-I. La dosis utilizada en el estudio fue de 10 µg/ml, y consideraban que cuando sólo se utiliza el PDGF-BB, es posible la formación de nueva inserción, pero no de relleno óseo.

En 1997, Green, (245) realizó un estudio en el que consideraba al epitelio gingival como una fuente importante de PDGF-A y PDGF-B, considerando al PDGF-A como importante modulador en los estadios iniciales de la inflamación, mientras que el PDGF-B tendría un papel más importante en momentos más tardíos de la cicatrización.

Gamal, en 1998, (246) estudió la aplicación de PDGF-BB y de IGF-I, sólo o en combinación, sobre superficies radiculares tratadas con HCl, concluyendo que el PDGF-BB es un potente estimulador para la adherencia de fibroblastos del ligamento periodontal a una concentración de 50 ng/ml, tanto en superficies radiculares tratadas con HCl como en superficies no tratadas.

Kasaca, en 1998, (247) estudió los efectos que producían los factores de crecimiento PDGF, TGF- β e IGF, sobre el DHT (5α -dihidrotestosterona, uno de los metabolitos más potentes en la estimulación de síntesis de fibroblastos). El estudio medía los efectos de la combinación de dichos factores de crecimiento y su efecto por separado, llegando a la conclusión de que la combinación de los factores de crecimiento, no conseguía un efecto sinérgico o multiplicador, respecto a cuando se utilizaban dichos factores de crecimiento por separado, posiblemente por un mecanismo fisiológico de homeostasis tipo feedback.

En 1999, Zaman, (248) estudió el efecto del PDGF-BB y de la BMP-2, aplicados sobre la superficie de raíces desmineralizadas. Se observó que las superficies tratadas con EDTA sobre las que se aplicaron factores de crecimiento, promovían la regeneración periodontal mediante un incremento tanto de la proliferación como de la diferenciación celular. Las concentraciones utilizadas fueron de $1\mu\text{g/ml}$ para el PDGF y de $3\mu\text{g/ml}$ para BMP-2. Proponían el EDTA como posible carrier de los factores de crecimiento.

El transporte de los factores de crecimiento constituye un problema y se investigan alternativas para aplicar estos factores de crecimiento al lugar donde se necesita promover la regeneración ósea.

Lee, en 2000, (249) propuso el uso de esponjas de quitosan con fosfato tricálcico (TCP) para transportar los factores de crecimiento al lugar elegido. Los resultados de su estudio indican que el PDGF-BB cargado en la esponja de quitosan/TCP, producía un efecto osteogénico en la regeneración ósea *in vivo*.

Gamal, en el 2000, (250) determinó que la concentración óptima de PDGF-BB para la estimulación de células del ligamento periodontal humano era de 50 ng/ml o superior, induciendo una estimulación de las células del ligamento periodontal a adherirse a la superficie radicular de dientes periodontales.

Munford, en el 2001, (251) estudió el efecto del PDGF-BB sobre células del ligamento periodontal comparándolo con el efecto provocado sobre fibroblastos gingivales, llegando a la conclusión que el PDGF-BB tenía un marcado efecto de

proliferación celular sobre células de ligamento periodontal, significativamente superior al inducido sobre fibroblastos gingivales, aunque sucedía al contrario cuando se analizaron los efectos inducidos sobre la migración celular.

Los últimos estudios sobre PDGF se basan en el uso de la ingeniería genética, como medio para transportar estos factores de crecimiento a los tejidos (252).

Factor de Crecimiento análogo a la Insulina (IGF)

Los factores de crecimiento análogos a la insulina (IGFs) son una familia de proteínas séricas de cadena simple que presentan una secuencia homóloga en un 49% a la proinsulina. Se han descrito dos polipéptidos, el IGF-I, y el IGF-II. El IGF-I, es una proteína formada por 70 aminoácidos con tres puentes disulfuro, posee un peso molecular de 7689 Kd y un punto isoelectrico de 8,4 (1). El IGF-II, es un péptido neutro de 67 aminoácidos y un peso molecular de 7471 Kd (253,254).

Estos factores de crecimiento son sintetizados por diferentes tejidos, como el hígado, tejido muscular liso y placenta. Estas proteínas se vehiculizan en el plasma como un complejo con proteínas específicas de adhesión (IGFBP) (255).

Entre su acciones biológicas se pueden destacar las siguientes: (253,256)

- 1) Capacidad de estimular la síntesis de matriz ósea por un efecto directo sobre los osteoblastos, estimulando su número y función, y por un aumento la proliferación de las células osteoprogenitoras.
- 2) Estimulación de la actividad mitogénica y quimiotáctica sobre las células del ligamento periodontal.
- 3) Estimulación de la síntesis de glucógeno en el hígado.
- 4) Capacidad de actuar sinérgicamente con el PDGF aumentando la regeneración periodontal.

Los estudios *in vitro* con células animales más significativos son los siguientes:

En 1988 Koch y cols, (257) demostraron que el IGF-I estimulaba la formación de la matriz ósea, en un estudio realizado con células obtenidas de calota fetal de rata, mediante la inducción de la proliferación celular y la secreción de componentes de la matriz extracelular. Se observó que los osteoblastos producían localmente el IGF-I y II.

Bloom y cols, en 1992, (258) demostraron el efecto mitogénico del IGF-I sobre los fibroblastos, además de estimular la síntesis de ADN en los fibroblastos del ligamento periodontal.

Matsuda y cols en 1992, (222) confirmaron también el efecto mitogénico y quimiotáctico que tiene el IGF-I sobre los fibroblastos del ligamento periodontal. Además observaron la existencia de un efecto sinérgico entre el PDGF-AB y el IGF-I.

Rutherford y cols, en 1992, (259) demostraron que el PDGF actúa de manera sinérgica con el IGF-I para sintetizar ADN en las células del ligamento periodontal.

Cho y cols, en 1994, (242) muestran la capacidad de el IGF-I de inducir una diferenciación prematura de las células del ligamento periodontal en osteoblastos y cementoblastos, pudiendo ser de utilidad para promover la osteogénesis y/o la cementogénesis.

Nishimura y Terranova, (228) en estudios realizados en 1996, también demuestran que IGF-I y II incrementan la migración de células del ligamento periodontal y a los fibroblastos gingivales de manera dosis-dependiente.

En cuanto a los estudios *in vivo* destacan los siguientes:

Lynch y cols, en 1989, (232) estudiaron el efecto de la terapia combinada PDGF +IGF-I (3µgr) en un gel inerte sobre tres perros Beagle con enfermedad periodontal natural con defectos horizontales, observando un incremento significativo de aposición ósea crestral en el grupo tratado con PDGF-IGF-I, con respecto al grupo control.

Posteriormente, en 1991, (233) Lynch y cols, estudiaron de nuevo la aplicación de PDGF+IGF-I (3 μ gr) en un gel de metilcelulosa al 4%, sobre trece perros Beagle que presentaban defectos verticales, siendo la regeneración ósea de un 40% en los tratados frente a un 6% en el grupo control a las cinco semanas.

También investigó Lynch, en 1991, (234) si la combinación de factores de crecimiento que promovía la regeneración periodontal tenía un efecto positivo en la formación de hueso alrededor de implantes. Los factores de crecimiento se vehiculizaban en forma de un gel de metilcelulosa recubriendo los implantes, siendo la dosis de combinación 4 μ gr de PDGF-BB+IGF-I. Se tomaron muestras de tejido a los 7 y 21 días. Tanto a los 7 como a los 21 días, se observó que el porcentaje de relleno óseo en los espacios periimplantarios y el porcentaje de la superficie del implante en contacto con el nuevo hueso era significativamente mayor en las zonas tratadas con factores de crecimiento. Tras analizar los resultados de su estudio, los autores sugieren que la terapia combinada de estos dos factores de crecimiento (PDGF-IGF-I) puede estimular la regeneración ósea alrededor de los implantes dentales.

En 1992, Becker y cols, (236) realizaron un estudio animal sobre cuatro perros Beagle, donde colocaron implantes de titanio inmediatamente postextracción. Se realizaron varios grupos. En el grupo 1, junto a los implantes se utilizó terapia regenerativa (RTG) con membranas de PTFE-e. En el grupo 2 se utilizaron implantes de titanio+RTG+terapia combinada de PDGF+IGF-I. Y en el grupo 3, a los implantes se les agregó injerto óseo desmineralizado (DFDB). Los resultados del estudio indicaron que la densidad ósea del tejido neoformado y regeneración ósea en los defectos asociados a los implantes (dehiscencias) tratados con esta terapia combinada de factores de crecimiento y RTG fue significativamente mayor frente al resto de grupos tratados con otras terapias.

Rutherford en 1992, (237) realizó el primer estudio en el que se demostró que los factores de crecimiento, también inducían la regeneración de los tres tejidos (cemento, hueso y ligamento periodontal) que forman el periodonto en primates, en los que se inducía periodontitis de manera experimental. La aplicación de la combinación de factores de crecimiento PDGF/IGF-I indujo una significativa regeneración periodontal. Se formó cemento extendiéndose coronalmente. También se formó hueso

sobre la cresta con reabsorción ósea de tipo horizontal. Por el contrario, en las lesiones control no se observó ni la presencia de nuevo hueso, ni de nuevo cemento, ni de nuevo ligamento periodontal.

En 1993, Rutherford y cols, (238) realizaron nuevos experimentos en monos con defectos angulares y periodontitis inducida experimentalmente, evaluando la eficacia de la terapia combinada de PDGF+dexametasona+matriz de colágeno como vehículo. Se observó una regeneración del periodonto perdido significativamente superior con respecto a los defectos del grupo control.

En 1994, Giannobile y cols, (244) realizan un estudio comparando los efectos de la combinación de factores de crecimiento sobre perros Beagle y monos. Los autores evaluaron la respuesta de la cicatrización a la cirugía periodontal con o sin el uso de un gel con PDGF+IGF-I. Sus resultados están en concordancia con los anteriores produciendo un aumento significativo en la regeneración periodontal comparada con los controles en ambos grupos. Estos resultados positivos de la aplicación de la terapia combinada de factores de crecimiento (PDGF+IGF-I), sobre defectos óseos y periodontales, justificaron la realización de ensayos clínicos en humanos .

En 1998, Howell y cols, (260) realizaron un estudio clínico randomizado y controlado sobre 38 pacientes con lesiones bilaterales periodontales, para estudiar el uso de la terapia combinada de factores de crecimiento (recombinantes) en el tratamiento de la periodontitis. La terapia combinada consistía en el uso de PDGF-BB+IGF-I, a diferentes dosis (50 y 150 µg/ml). Ninguno de los pacientes desarrolló anticuerpos frente a estos factores de crecimiento recombinantes. Se observó una neoformación ósea significativamente superior en los grupos tratados con esta combinación de factores de crecimiento a concentraciones de 150 µg/ml con respecto al grupo de 50 µg/ml y grupo control, evidenciándose un efecto dosis-dependiente.

Factor de Crecimiento Fbroblástico (FGF)

Son una familia de polipéptidos cuya misión es la de controlar la proliferación, diferenciación y otras funciones celulares en aquellas células derivadas del mesodermo

y neuroectodermo, aunque existen siete formas de FGF, se han descrito extensamente dos de ellas (261):

- El Factor de Crecimiento Fibroblástico Ácido (FGF- α).
- El Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGF- β).

El FGF básico es una cadena peptídica simple compuesto por 146 aminoácidos, tiene un punto isoeléctrico comprendido entre 9-6 y un peso molecular entre 16.000 y 18.000 daltons (261). El FGF ácido es un péptido de 140 aminoácidos, existiendo una porción homóloga del 55% entre los FGF ácido y básico, tiene un punto isoeléctrico comprendido entre 5,6-6 y un peso molecular de unos 15.000 daltons (261).

Estos dos factores de crecimiento están clasificados por diferentes genes pero son similares en estructura y función. Éstos factores son potentes mitógenos y quimiotácticos para las células endoteliales y para gran variedad de células de origen mesenquimatoso como los fibroblastos, los osteoblastos, los condrocitos, células musculares lisas y mioblastos esqueléticos.

Entre sus acciones biológicas están las siguientes:

- Estimulación de la angiogénesis por un mecanismo directo, al estimular la mitosis y migración de células endoteliales.
- Estimulación y coordinación de la mitogénesis de múltiples tipos celulares durante el crecimiento, mantenimiento y reparación tisular.

Cafesse y Quiñónes (262) creen que estos factores de crecimiento probablemente necesitan la acción sinérgica de otros factores de crecimiento para estimular al máximo la síntesis de ADN y el crecimiento celular.

Según Hauschka y cols, (263) estos dos factores se almacenan en la matriz ósea y podrían ser de gran importancia en la regulación de los osteoblastos.

Entre los estudios *in vitro* más importantes destacan los siguientes:

Terranova y cols, en 1989, (264) demostraron los efectos que tenía el FGF β sobre las células del ligamento periodontal y sobre células endoteliales, siendo el resultado una estimulación en la proliferación y migración de ambas. Según estos autores, el FGF β se adhería a la dentina, incrementándose esta unión si la dentina se sometía a procesos de acondicionamiento previos con clorhidrato de tetraciclina o con ácido cítrico, que provocarían una exposición del colágeno tipo I, favoreciendo de este modo la adhesión.

En 1989, Tweden y cols, (265) también demostraron que el FGF β estimulaba la proliferación y la migración de células endoteliales.

Entre los estudios “*in vivo*” destacan los siguientes:

En 1991, Eppley y cols, (266) realizaron un estudio con el objetivo de estudiar la evolución del tratamiento con autoinjertos óseos en tejidos irradiados, con o sin la utilización de FGF β . Los resultados de los defectos tratados con autoinjerto+FGF β fueron significativamente mejores en cuanto a cicatrización y relleno de los defectos, con respecto a los defectos en los que no se aplicó FGF β .

En 1995, Schliephake y cols, (267) realizaron un estudio en cuatro minipigs, en los que se realizaron injertos óseos subperiósticos de origen bovino, cubiertos con una membrana de poliláctico, para la posterior colocación de implantes, unos asociados con FGF β y otro sin él. Los resultados demostraron crecimiento óseo independientemente del uso o no del FGF β .

En 1997, Takayama y cols, (268) analizaron el efecto que el FGF β tenía en la proliferación de células del ligamento periodontal midiendo los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina y la formación de nódulos de calcificación y síntesis de matriz extracelular. Los autores llegaron a la conclusión de la importancia que tenía este factor en la inducción del crecimiento de células inmaduras de ligamento de periodontal, lo que podría acelerar la regeneración periodontal.

En 1998, Sasaki y cols, (269) publicaron el posible papel que el FGF β jugaría en el agrandamiento gingival inducido por fenitoína, demostrando que los niveles en suero de FGF β podían estar relacionados en parte con este sobrecrecimiento gingival.

Hosokawa y cols en el 2000, (270) en un modelo experimental en perros Beagle, demostraron que la aplicación controlada mediante esferas de colágeno de FGF β aceleraba la regeneración ósea en defectos protegidos con membranas de PTFE, con respecto de los controles.

También en el 2000, Rossa, (271) demostró en un estudio en cinco perros Beagle, el efecto positivo que tenía el FGF β en defectos de furca clase III mediante aplicación de técnica de RTG.

McCracken y cols, en el 2001, (272) en un estudio realizado en tibias de 32 ratas, examinaron el comportamiento que el FGF α podría tener sobre la cicatrización y respuesta ósea en la colocación de implantes. Los autores llegaron a la conclusión de que el FGF α podría incrementar la producción de hueso alrededor de los implantes en este modelo animal.

Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)

Se aisló originalmente a partir de cultivos celulares de hipófisis. Se trata de una proteína homodimérica cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud del 24% con el PDGF-BB, pero se une a distintos receptores que el PDGF e induce distintos efectos biológicos. Es un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales, su importancia queda manifestada por su acción angiogénica “*in vivo*”. (273)

Entre los estudios “*in vivo*” sobre el VEGF en nuestro campo destacan:

Booth y cols, en 1998, (274) estudiaron el papel del VEGF en la enfermedad periodontal encontrando niveles más bajos de VEGF en pacientes con enfermedad, con respecto a pacientes en ausencia de enfermedad. Concluyeron que el VEGF podría ser

relevante en los procesos de angiogénesis y que los niveles en suero de VEGF estaban influenciados por el grado de salud periodontal de los pacientes, en este estudio.

En el 2001, Cornellini y cols, (275) realizaron un estudio sobre el papel del VEGF y la densidad microvascular (MVD) alrededor de implantes con mucosa queratinizada normal por un lado y en tejidos blandos periimplantarios alrededor de implantes fracasados. Los resultados del estudio mostraron diferencias tanto en la MVD, significativamente superiores en los tejidos con periimplantitis, como en VEGF también en menores concentraciones que en tejidos sanos, aunque no encontraron correlación entre el VEGF y el estado de salud o enfermedad de los tejidos periimplantarios.

Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El EGF es una proteína de cadena simple de 53 aminoácidos con tres puentes disulfuro en su estructura. Posee un peso molecular de 5.300-5.500 D. Este factor de crecimiento ha sido aislado en las glándulas salivales, glándulas de Bruner, plaquetas, fluido amniótico y cerebrospinal. Se ha comprobado que el EGF estimula la síntesis de ADN y el crecimiento celular de gran variedad de células incluyendo a las células epiteliales, endoteliales y de origen mesodérmico (276).

Sus acciones biológicas se resumen (277):

- Efectos mitogénicos y quimiotácticos en fibroblastos y células epiteliales.
- Estimula la formación de tejido de granulación.
- Inhibe la liberación de ácido por la mucosa gástrica.

Entre los estudios *in vitro* más significativos destacan:

En 1987, Thesleff, (278) observó que los restos epiteliales de Malassez expresaban un alto número de receptores para el EGF.

En 1988, Cho y cols (279), demostraron que los fibroblastos del ligamento periodontal, los preosteoblastos y precondrocitos expresaban un alto número de receptores para el EGF.

En 1990, Modéer y cols, (280) observaron como la fenitoína producía un aumento significativo del número de receptores celulares para el EGF en fibroblastos en cultivo.

En 1992, Matsuda y cols, (222) estudiaron los efectos que tenía el EGF sobre células de ligamento periodontal de rata. Los autores llegaron a la conclusión de que el EGF incrementaba los efectos quimiotácticos en los fibroblastos del ligamento periodontal y suprimía la síntesis de colágeno.

En 1993, Hormia, (281) demostró que la concentración en saliva en pacientes con periodontitis juvenil era mucho más alta, aunque no se conoce el motivo de esta relación.

En 1994, Cho y cols, (240) estudiaron los receptores para el EGF en los fibroblastos del ligamento periodontal. Los autores llegaron a la conclusión de que aunque existían, no parecían tener un efecto significativo, sobre la mitosis y quimiotaxis de estas células. Aunque los autores han sugerido que podría tener una importancia relevante en la regulación de la anquilosis.

En 1996, Nishimura y Terranova, (228) observaron que el EGF incrementaba la migración de células del ligamento periodontal y de fibroblastos gingivales de manera dosis-dependiente.

Factor Transformador de Crecimiento (TGF)

Se le denominó de esta forma ya que se aisló por primera vez en tejidos transformados, en concreto, de sarcomas. Inicialmente sólo se podían extraer de tejidos transformados. Se trataba de un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivo celular, la acción del TGF sobre estas células era la alteración de su fenotipo, transformándolas en tumorales (282).

Existen dos tipos de esta clase de factor:

- TGF α
- TGF β

TGF α : Está estrechamente relacionado con el EGF, estos factores tienen en común un 42% de su secuencia de aminoácidos. Se unen a los mismos receptores estableciéndose competencia. Su gen está localizado en el cromosoma 2. Su peso molecular es de 5,6 D. Se sintetiza como un precursor de 160 aminoácidos, aunque la parte activa sólo consta de 50 (282).

Entre sus acciones biológicas destacan (283):

- Aumentan la proliferación y la migración de células epiteliales.
- Liberan iones calcio del hueso.
- Inhiben la actividad de los osteoblastos.
- Efecto angiogénico.
- Interviene en el desarrollo tumoral tanto de una forma autocrina como paracrina.

TGF β : Es un dímero formado por dos subunidades de 112 aminoácidos, unidas por puentes disulfuro. Tiene un peso molecular de 25.000 D. El gen correspondiente se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 19. Esta molécula pertenece a la superfamilia de proteínas que incluye TGF β 1 hasta TGF β 6 y proteínas morfogenéticas entre otras (283).

Prácticamente todas las células sintetizan TGF- β 1 y todas las células expresan receptores para los TGF, este hecho indica que TGF- β 1 afecta de alguna forma a todos los procesos fisiológicos (284).

Entre sus acciones biológicas destacan:

- Inhibición de la proliferación de células mesenquimales, epiteliales, endoteliales y transformadas.

- Estimula la proliferación de células mesequimales, endoteliales y transformadas.
- Transformación fenotípica de fibroblastos.
- Mejora la deposición de matriz extracelular aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación.
- Efecto inmunosupresor

Entre los estudios *in vitro* más significativos destacan:

En 1992, Matsuda y cols, (222) demostraron que el TGF β provocaba inhibición de la respuesta mitogénica de las células del ligamento periodontal, no teniendo efectos mitogénicos para estas células.

En 1993, Oates y cols, (223) compararon la actividad mitótica del TGF β con la interleukina-1 y el PDGF en fibroblastos del ligamento periodontal, llegando a la conclusión de que el TGF β tenía una menor acción mitótica que el PDGF.

En 1994, Dennison y cols, (224) demostraron que tanto el TGF β como el PDGF provocaban mayor incremento en la proliferación de las células del ligamento periodontal que en los fibroblastos gingivales.

En 1996, Nishimura y Terranova, (228) evaluaron la capacidad del TGF β para estimular la respuesta migratoria de células del ligamento periodontal y de los fibroblastos gingivales. Este incremento en la respuesta era de carácter dosis-dependiente.

En 1999, Jin Gao y cols, (283) demostraron que las células del ligamento periodontal expresaban múltiples receptores para el TGF β , presentado este factor un papel importante en el desarrollo y en la posterior maduración del periodonto. Estos autores demostraron la existencia de mayor número de receptores para el TGF β_2 que para el TGF β_3 .

En 1999, Chien y cols, (285) observaron la importancia que el TGF β y sus isoformas 1, 2 y 3 tenían para inducir la diferenciación de las células del ligamento periodontal y la síntesis de proteínas no colágenas de la matriz extracelular.

Joo y cols, en 1999, (286) investigaron el efecto del TGF β sobre osteoblastos cultivados sobre diferentes superficies de hidroxapatita. Los autores llegaron a la conclusión de que la presencia de TGF β favorecía la proliferación de osteoblastos de una manera dosis-dependiente en todas las superficies en que fueron cultivados.

En el 2001, Adamo y Mailhot, (287) estudiaron el efecto del TGF β y de la PGE₂ sobre la conexina-43, que funciona como unión tipo gap en células óseas. Los autores llegaron a la conclusión de que esta proteína no se veía alterada tras aplicación exógena de TGF β y PGE₂.

Entre los estudios *in vivo* más significativos destacan:

Bosch en 1996 (288) sugirió que el uso de TGF β en defectos de calota craneal de rata no promovía la regeneración ósea.

En 1998, Pack y cols, (289) realizaron un estudio sobre el papel que juega el TGF β ₁ con técnicas de RTG o sin ellas, sobre 48 defectos de furca tipo II, en 24 ovejas. Los autores llegaron a la conclusión de que el TGF β ₁ favorecía la regeneración ósea en este tipo de defectos y que este efecto estimulador aumentaba todavía más en presencia de membranas Gore Tex.

En 1999, Steinsvoll y cols, (290) en un estudio sobre la expresión del TGF β ₁ en tejidos periodontales, que presentaban enfermedad periodontal crónica, llegaron a la conclusión de que esta citoquina estimulaba los procesos de cicatrización en los pacientes que presentaban esta enfermedad.

En el 2000, Ruskin y cols, (291) estudiaron la capacidad que tenía el TGF β ₁ junto con membranas de barrera (PTFEe) en la regeneración ósea en defectos realizados sobre la cresta alveolar canina. Los autores concluyeron que el uso de TGF β ₁

combinado con el uso estas membranas, aumentaba en gran medida la regeneración del hueso.

En el 2000 Hong (292) usando TGF β aislado en defectos en calota craneal de conejas no consiguió un incremento en la regeneración ósea, sin embargo cuando lo vehiculizaba en cápsulas de gelatina observó un incremento significativo de hueso regenerado.

Otros autores también han sugerido que la efectividad del TGF β en procedimientos de regeneración ósea depende en gran medida del sistema en que se vehiculiza (293).

3.2.3. PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

a) Antecedentes

La aplicación de la fibrina y otros hemoderivados ha sido utilizada en traumatología y cirugía vascular desde la década de los 70 (198). El uso del coágulo de fibrina en el campo de la cirugía oral y maxilofacial lo refiere Matras en 1982 (198). Ella describió las cualidades de este producto y sus aplicaciones, como sellado de tejidos, hemostasia y promoción de la cicatrización. Posteriormente en 1985 (199) presentó los casos en los que utilizaba este coágulo: anastomosis de nervios, hemostasia en defectos de tejidos blandos, como sustituto de la sutura en la fijación de injertos de piel y fracturas óseas.

El coágulo de fibrina desarrollado por Matras y cols, (198) se comercializó en Europa bajo el nombre de Tissel, sin embargo este producto no fue aprobado en EEUU por el riesgo de transmisión viral. Este riesgo de transmisión hizo que se desarrollaran sistemas para la preparación autóloga de este material (200,201), aunque también surgieron inconvenientes, como el tiempo de preparación de este agente autólogo y el coste.

El descubrimiento de factores de crecimiento en el adhesivo de fibrina autólogo (AFA), despertó el interés de los investigadores, ya que este producto podía actuar no

sólo como agente osteoconductor y vehiculizador de injertos, sino como posible factor osteoinductor (205,206).

En 1994 Tayapongsak y cols (203) introdujeron la novedosa idea de la aplicación de un coágulo de fibrina en la reconstrucción de defectos mandibulares junto con injerto óseo autógeno, identificando radiográficamente tempranas consolidaciones óseas en 33 casos, atribuyendo a la red de fibrina un incremento de la osteoconducción sobre las células osteocompetentes del injerto. También refieren su utilización como vehículo para la compactación de injertos, aunque ya se utilizara de manera rutinaria para este fin en traumatología durante las últimas décadas (204).

El objetivo que se propusieron los investigadores fue aumentar la concentración de factores de crecimiento en ese coágulo, comenzando las investigaciones sobre lo que hoy conocemos como plasma rico en plaquetas (PRP).

El adhesivo de fibrina autólogo (AFA) hay que diferenciarlo del PRP, puesto que el primero es un concentrado de fibrinógeno, factor XIII, fibronectina y factores de crecimiento en baja concentración, mientras que el otro es un concentrado plaquetario rico en factores de crecimiento.

En 1995, Slater y cols, (207) mostraron en un trabajo *in vitro*, resultados que indican un aumento en la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos, y un incremento en la síntesis de matriz extracelular cuando se cultivan dichos osteoblastos en presencia de Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF).

En 1997, Whitman (208) detalló las diferencias entre el AFA y el PRP y propuso algunas posibles aplicaciones del PRP en cirugía bucal y maxilofacial, como reconstrucciones mandibulares, procedimientos de elevación de seno, fisuras palatinas y procedimientos relacionados con la colocación de implantes.

En 1998, Marx y cols, (209) aplicaron sus estudios sobre PRP, y refirieron la existencia de un incremento del número de plaquetas en este concentrado de un 338% con respecto a los niveles basales plaquetarios, mostrando la presencia de al menos tres factores de crecimiento PDGF, TGF- β_1 y β_2 , refiriendo la existencia de receptores en el

hueso para dichos factores de crecimiento. La utilización de este preparado junto con injerto óseo autógeno en reconstrucciones mandibulares demostró que producía una aceleración y aumento en la densidad del hueso formado a los 6 meses respecto del grupo control, valorado mediante radiografías panorámicas. La activación del PRP la realizaron mediante la adición al preparado de trombina bovina.

En 1999, Anítua (210) refirió la utilización del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en pacientes que presentaban enfermedad periodontal, susceptibles de tratamiento implantológico y en pacientes con fracturas verticales en dientes que se sustuirían mediante implantes unitarios, con resultados significativamente mejores, desde el punto de vista de la regeneración y maduración ósea con respecto al grupo control y además, estaría exento de riesgos para el paciente.

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

4.1. Material

4.1.1. Animales de experimentación

Se utilizan 16 conejas sanas de la cepa Nueva Zelanda, adultas y con un peso de 3,5 Kg en las que se indujo osteoporosis experimental. Se mantuvieron estabuladas en jaulas individuales en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid durante el período de experimentación.

4.1.2. Preparación del modelo de osteoporosis experimental

Se siguió el modelo propuesto por Mori (10) modificado posteriormente por Tresguerres (11).

Ovariectomía (Ovx): Tras la anestesia intramuscular del animal con ketamina (Imalgene 1000[®]) a dosis de 0,75 mg. por kg. y xilacina (Rompún[®]) a dosis de 0,25 mg. por kg. (Weisbroth y Fudens, 1972. Green y cols 1981)(294) se rasura el abdomen y se procede a la desinfección de la piel con povidona yodada (Betadine[®]). Se realiza una laparotomía medial para acceder a los ovarios, una vez localizados se seccionan los ligamentos uteroovárico y tuboovárico que fijan el ovario y se procede a su extirpación. La pared abdominal se sutura por planos con sutura reabsorbible (daxon[®] 3/0) mediante puntos simples y la piel se sutura con seda 3/0 mediante sutura continua. En el postoperatorio se establece tratamiento antibiótico (Terramicina[®]) en el agua de bebida para prevenir infecciones postquirúrgicas.

Dieta Hipocálcica: Tras realizar la ovariectomía los animales son alimentados con una dieta baja en calcio (0.07% de calcio en vez de 0.45% de la dieta normal del conejo). La dieta hipocálcica se consigue mediante la mezcla de un 74,2% de cebada, un 20% de salvado de trigo, un 5% de soja, 0,3% de sal y un 0,5% de corrector sin calcio (Nutrient Requirements of Rabbits, 1977)(295) (fig 11) y se mantienen alimentados así durante 6 semanas. Transcurrido este período se ha conseguido inducir osteoporosis en los animales, como se demostró en estudios previos (296).

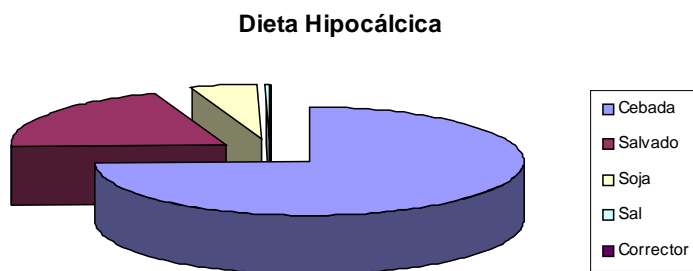


Fig 11. Proporciones de los componentes de la dieta hipocálcica al 0.07%.

4.1.3. Material de experimentación

1. Como factores de crecimiento se utilizaron los factores de crecimiento plaquetarios en forma de gel y conocido como plasma rico en plaquetas (PRP). La obtención del PRP se realizó según el protocolo de Anitua (210).
2. Como material de injerto se utilizó la hidroxiapatita bovina (Bio-Oss®). Se utilizó 0,25 g de hidroxiapatita bovina por cada cilindro de titanio tanto cuando se utilizó de forma aislada como cuando se combinó con factores de crecimiento.
3. Para delimitar la región se utilizó como material de experimentación cilindros de titanio de superficie rugosa de 9 mm de diámetro, 4 mm de altura y 0,5 de grosor.

4.1.4 Material farmacológico

- Ketamina comercializada bajo el nombre de Imalgene®
- Xilacina comercializada bajo el nombre de Rompún®
- Pentobarbital comercializado bajo el nombre de Doletal®
- Heparina Sódica
- Xileno

4.1.5 Material para obtención del PRP

- Centrífuga Nahita® 2014

- Tubos citratados Venoject[®] de 5cc
- Tubos de ensayo
- Micropipetas

4.1.6. *Material densitométrico*

Densitómetro modalidad XR Norland[®].

4.1.7. *Material histológico*

- Microscopio óptico Zeiss[®]
- Material para tinción de las muestras con hematoxilina-eosina, Tricrómico de Masson, Picrosirius de Junqueira, Azul de Toluidina.
- Sistema de corte y pulido para tejidos duros (EXAKT) (figuras 12,13)
- Sistema de captura de imágenes histológicas, compuesto por una cámara de video y transferencia de la imagen al ordenador.
- Software para histomorfometría. Analizador de imágenes MIP-4.



Fig 12 . Sistema de corte para tejidos duros EXAKT



Fig 13 . Sistema de pulido para tejidos duros EXAKT

4.2. Metodología

4.2.1. Método de obtención del PRP

Se procedió a la extracción de sangre, previa a la anestesia del animal de experimentación. Se extraen 10 cc de sangre de la vena auricular marginal de cada uno de los animales.

La sangre se deposita en unos tubos de 4,5 cc con citrato trisódico al 3,8% como anticoagulante. Se centrifugan los tubos a 1.500 r.p.m. durante 7 minutos con la centrífuga, lo que permite definir en los tubos de extracción:

- 1) Una zona en la base del tubo de color rojo oscuro y que corresponde a concentrado de hematíes.
- 2) Un sobrenadante de color muy claro, que corresponde al plasma, y que se puede dividir a su vez en tres fracciones.
 - El tercio superior se denomina plasma pobre en factores de crecimiento (PPP) y ocupa alrededor de 0,5 cc.
 - En el tercio inmediatamente inferior al anterior, se encuentra el plasma con una concentración media de factores de crecimiento y ocupa también alrededor de 0,5 cc.
 - El tercio por debajo del anterior e inmediatamente por encima del concentrado de hematíes se conoce como plasma rico en factores de crecimiento (PRP), con un volumen aproximado de 0,5 cc.

Procedemos a separar cada fracción con unas micropipetas de 0,5 cc y las depositamos en unos tubos de cristal estériles previamente etiquetados.

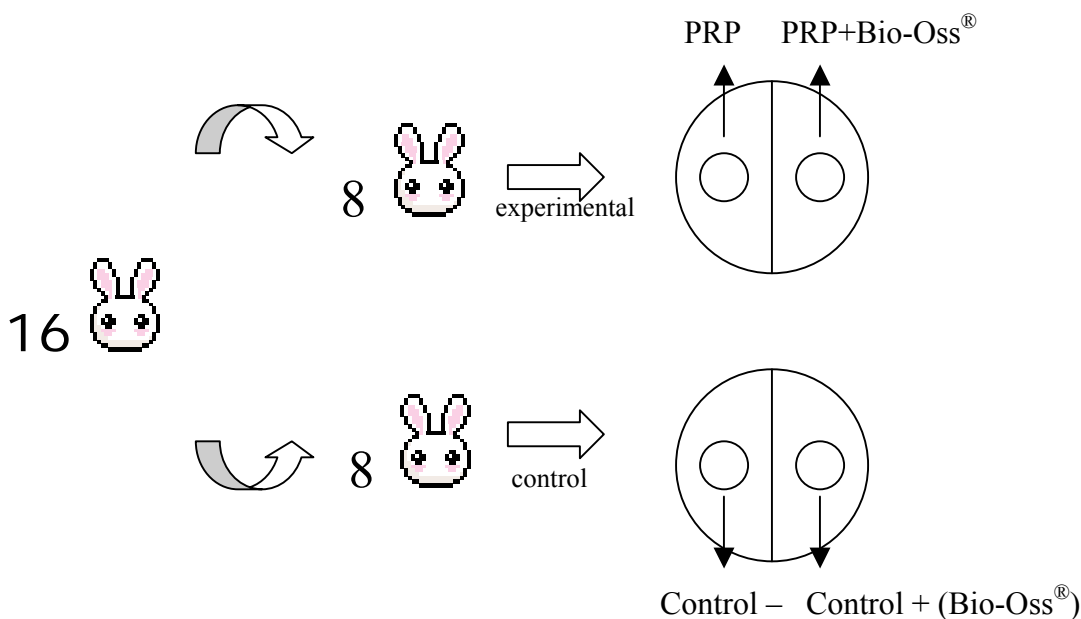
En este estudio exclusivamente trabajamos con la fracción denominada PRP.

Posteriormente se procede a la activación del P.R.P, mediante Cl_2Ca al 30%, para revertir la cascada de coagulación, y se añade en una proporción de 0,05 cc de Cl_2Ca por cada 1cc de P.R.P.

De este modo transcurridos entre 7 y 10 minutos obtenemos un coágulo estable, que se comporta como un vehículo natural de los factores de crecimiento.

4.2.2. Fase experimental

Tras la ovariectomía y las 6 semanas de dieta hipocálcica se procede a la cirugía para la colocación de los injertos. Las 16 conejas se asignan aleatoriamente en dos grupos experimental y control.



Se induce la anestesia mediante inyección intramuscular de ketamina (Imalgene[®] 1000, 0,75mg/Kg, Merial,Lyon,France) y Xilacina (Rompún[®] 0,25mg/Kg, Bayer,Leverkusen,Germany). Se rasura la región craneal entre los pabellones auriculares y se desinfecta la superficie cutánea mediante povidona yodada.

A través de una incisión sagital (4cm) a nivel de la línea media de la cabeza, se separa cuidadosamente el periostio y se expone la calota craneal del animal (figura 14)

para realizar mediante una trefina de 1cm de diámetro un surco circunferencial de 0,2 mm de profundidad en ambos huesos parietales (figura 15) que permitirán estabilizar los cilindros de titanio, uno a cada lado de la sutura media sagital (figura 16). Tras realizar el surco, se efectúa decorticación con fresa redonda para eliminar la capa más superficial de la cortical y favorecer la regeneración.

En los animales del grupo experimental los cilindros de titanio se rellenan con PR.P+Bio-Oss[®] en el hueso parietal derecho, mientras que el izquierdo sólo se rellena con PRP (figura 17), mientras que en el grupo control, se rellena el cilindro de titanio del hueso parietal derecho con Bio-Oss[®], y el lado izquierdo no recibe ningún tipo de injerto (figura 18) constituyendo los controles + y – respectivamente.

Posteriormente se sutura cuidadosamente el periostio con sutura reabsorbible (daxon[®] 3/0) mediante puntos simples (figura 19) y la piel con seda (3/0) mediante sutura continua (figura 20). En el postoperatorio se establece tratamiento antibiótico (Terramicina[®]) en el agua de bebida.

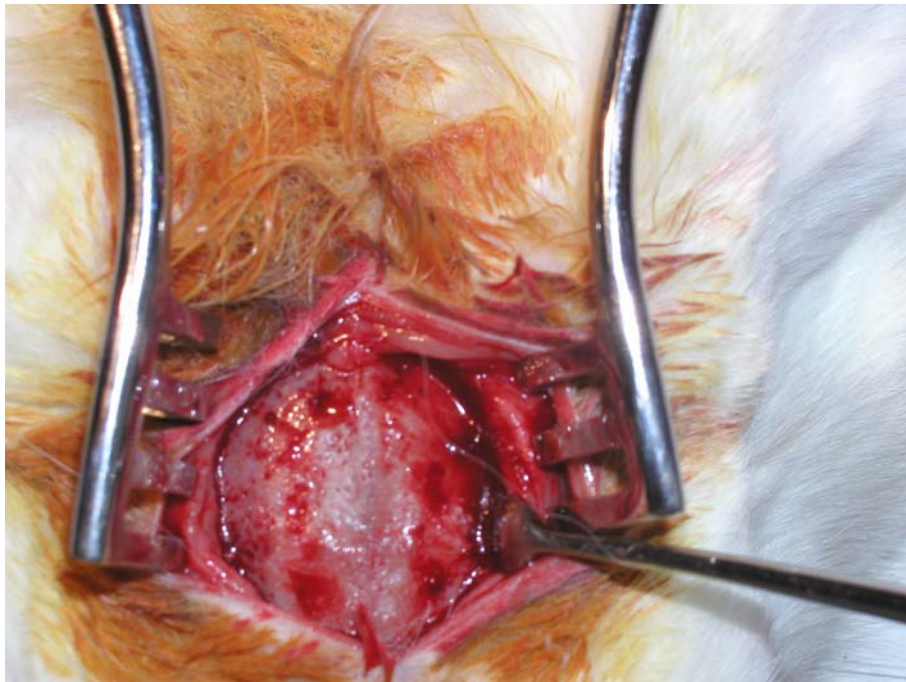


Fig 14. Cráneo del conejo expuesto por disección subperióstica. La estabilización de los cilindros va a ser efectuada en los huesos parietales

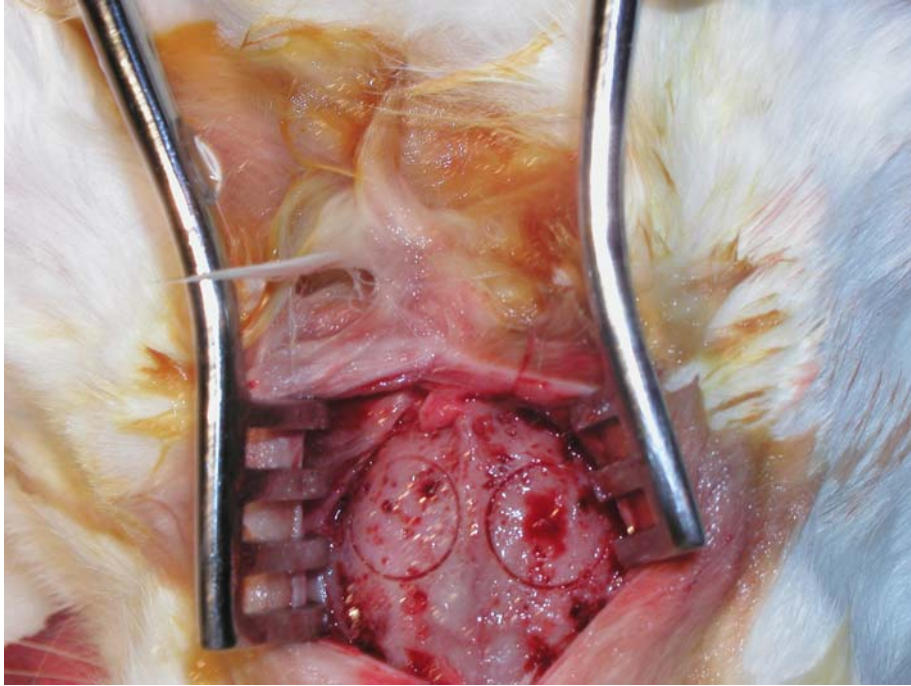


Fig 15. Surcos realizados en los huesos parietales efectuados con trefina para la estabilización de los cilindros

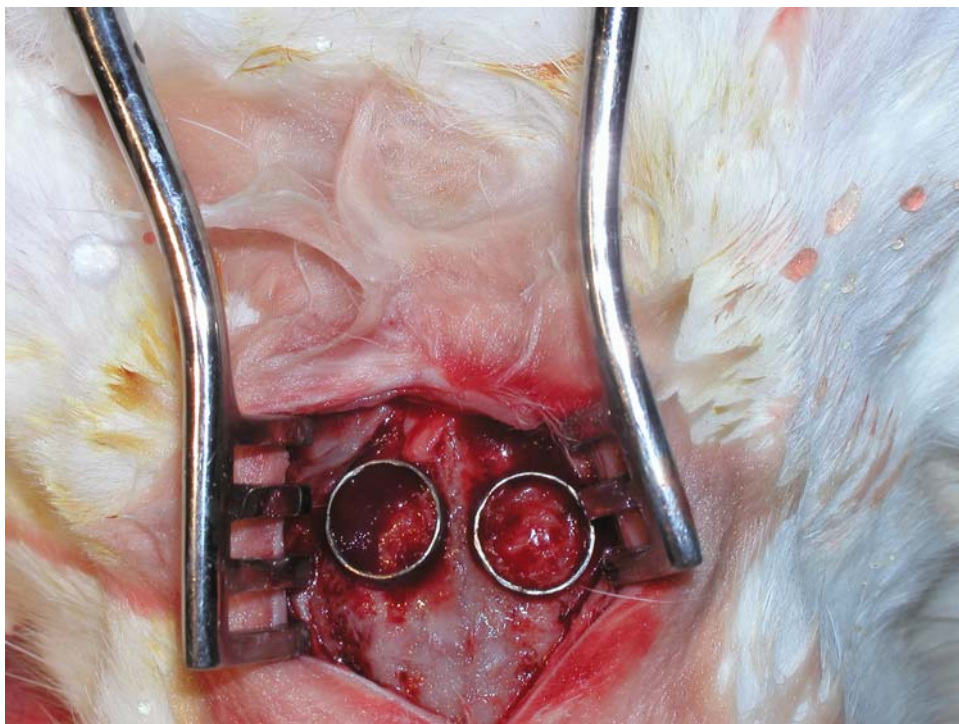


Fig 16. Estabilización de los cilindros

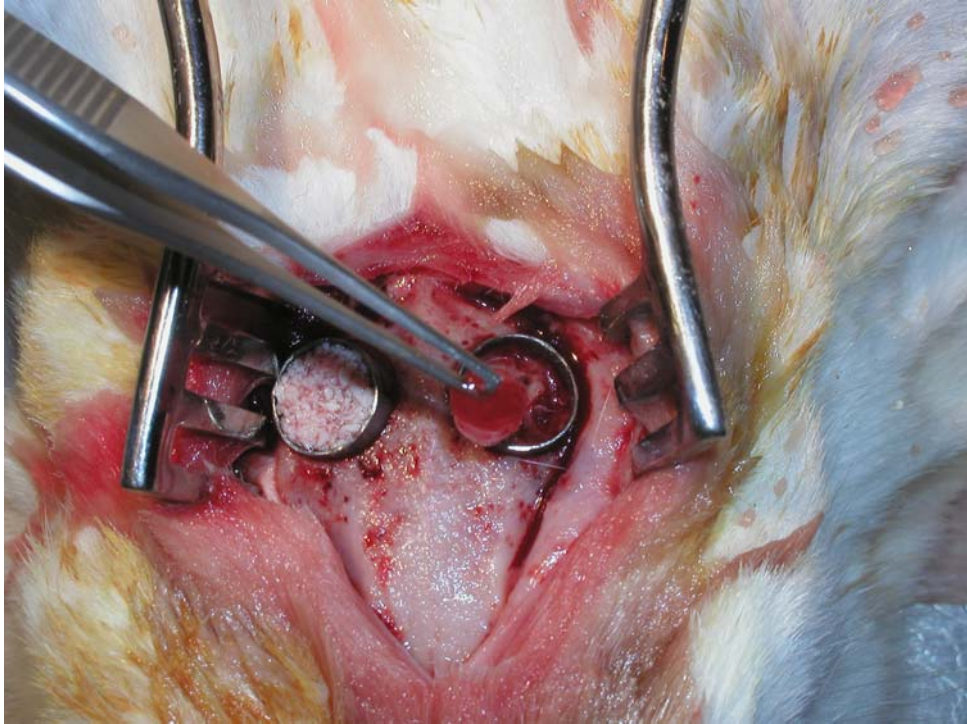


Fig 17. Colocación del material de injerto en el grupo experimental. PRP+Bio-Oss en el cilindro del lado derecho y PRP aislado en el izquierdo

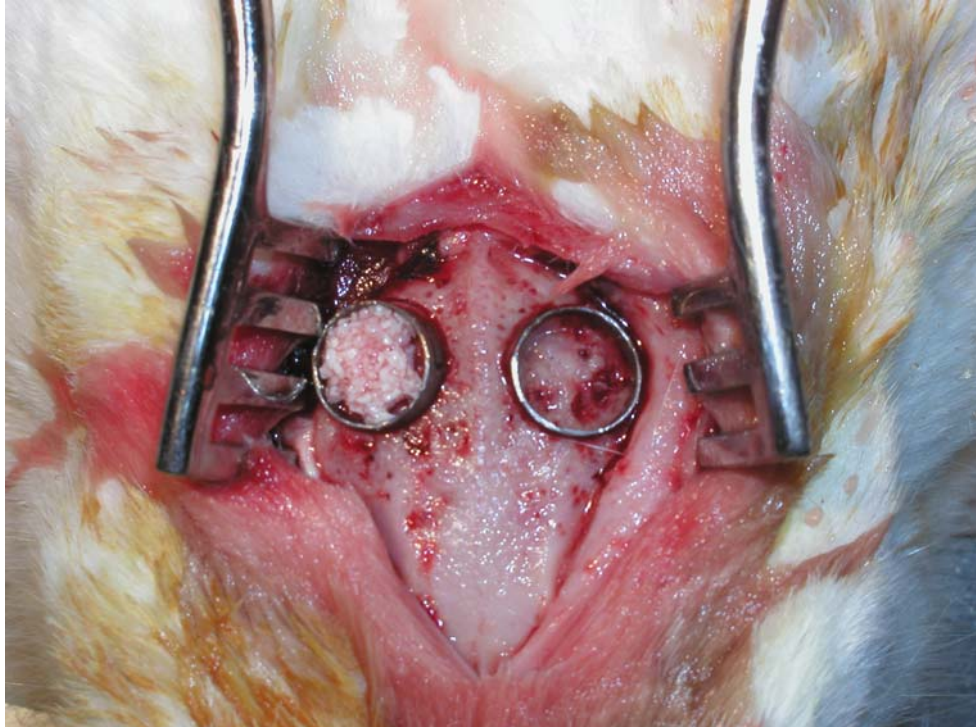


Fig 18. Colocación del material de injerto en el grupo control. Bio-Oss en el cilindro del lado derecho y nada en el izquierdo

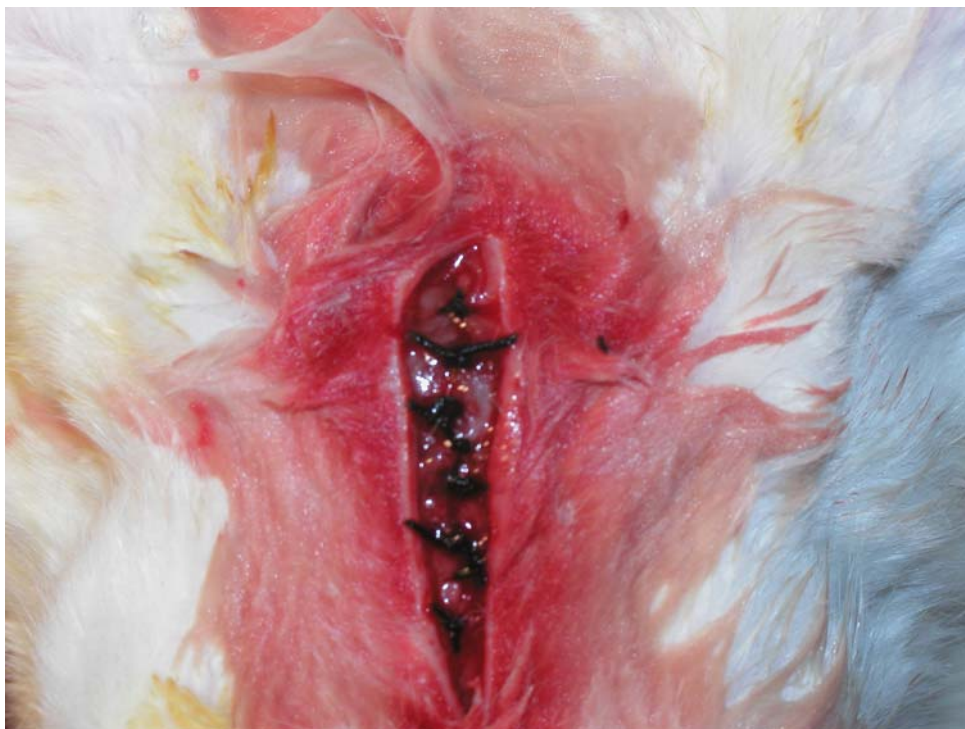


Fig 19. Sutura del periostio con puntos simples



Fig 20. Sutura de la piel con puntos simples

4.2.3. Estudio histológico

Preparación de las muestras: 4 semanas después de realizado el procedimiento experimental se sacrifican los animales con pentobarbital sódico IV a dosis letales (1cc/Kg) extrayendo los cilindros con un margen de 1 cm de hueso alrededor, y realizando en todas las muestras un defecto circular mediante fresa redonda pequeña en el hueso frontal, para facilitar la orientación antero-posterior de la calota en el estudio histológico. Las muestras se fijan en formaldehído al 10% tamponado a pH 7. La deshidratación se realiza mediante alcohol al 60% que se va sustituyendo por alcoholes de mayor concentración hasta terminar con alcohol al 100%. Posteriormente se incluyen en 2-hidroxietilmetacrilato, según el método de Donath y Breuner (1982) (297). Para ello se utiliza un monómero de metacrilato que será sustituido gradualmente por un polímero de metacrilato que permite su endurecimiento por fotopolimerización con luz ultravioleta, durante dos horas con luz blanca y seis con luz azul (tabla XIII). Con los bloques así obtenidos se realiza un primer corte grueso y posteriormente, se efectuarán distintos cortes de 200 micras de grosor con la banda de corte Exakt®, para obtener el corte histológico definitivo de hueso y titanio. Cada sección así obtenida se lija con la pulidora del Exakt® hasta conseguir el grosor final de 50-80 micras para su estudio con microscopía óptica. Tras el corte se procede a la tinción histológica. El estudio histológico se realiza en el Departamento de Anatomía y Embriología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares.

DESHIDRATACIÓN		FOTOPOLIMERIZACIÓN	
Alcohol 60%	10-15d		
Alcohol 60%	10-15d		
Alcohol 80%	10-15d		
Alcohol 96%	10-15d		
Alcohol 100%	10-15d		
Alcohol/GMA 50%	20d	Luz blanca	2h
		Luz azul	6h
INCLUSIÓN			
GMA 100%	10-15d		
GMA-T-7200 50%	10-15d		
T-7200 100%	10-15d		
T-7200 100%	60d		

Tabla XIII. Resumen de los pasos empleados para el procesamiento de las muestras objeto de estudio, previo a su corte y pulido.

Para el *estudio histológico* se han empleado las siguientes tinciones (298):

- *Tinción de Masson*, que permite diferenciar en verde el tejido óseo calcificado y en naranja-rojo el osteoide no calcificado
- *Azul Alcian (AA)*, que indica la presencia de proteoglicanos ácidos sulfatados (se tiñen de azul y forman estrías), coincidiendo con zonas de gran reabsorción ósea, debido a la liberación de los proteoglicanos de la matriz por la reabsorción osteoclástica
- *Tinción de Picrosirius de Junqueira*, que al polarizarse, permite ver, por birrefringencia, las fibras de colágeno que tienen la misma dirección.
- *Hematoxilina-eosina*, que permite diferenciar células, ya que la hematoxilina tiñe el núcleo y la eosina el citoplasma celular.
- *Azul de Toluidina y hematoxilina*: Permite diferenciar con claridad la presencia de osteoblastos, y osteoclastos

4.2.4. Valoración morfométrica: El estudio morfométrico, permite el análisis cuantitativo del hueso y valora:

1. Área total de la muestra de estudio
2. Densidad de área de hueso neoformado en las muestras
3. Densidad de área de Bio-Oss[®] remanente

El concepto de Densidad de Área se entiende como la relación entre la superficie de hueso neoformado o de Bio-Oss[®] remanente y el área total de la sección, multiplicado por 100.

Para el estudio morfométrico se colocaron las muestras histológicas en el microscopio óptico con la lupa óptica calibrada a 6 aumentos. A la imagen proyectada en el ordenador se le colocó una rejilla cuadrículada de 300 puntos y se contaron por

separado los puntos de la rejilla (impactos) que coincidían con el hueso regenerado y con partículas de Bio-Oss[®]. Se eligieron 6 muestras de cada animal mediante un sistema aleatorio sistemático.

4.2.5. Valoración densitométrica: Se realiza la densitometría en las muestras histológicas, con el densitómetro XR-26 Norland[®] (Norland Co, Fort Atkinson, Wisconsin, EEUU), modalidad de investigación, para obtener la densidad mineral ósea (DMO) expresada en gramos de calcio por centímetro cuadrado (g/cm^2). La resolución de medida en cada uno de los cilindros fue de $0,5 \times 0,5$ mm y la velocidad de exploración de 40 mm/s.

Para obtener la DMO se seleccionaron 3 áreas (fig 21):

- La primera se eligió alejada de las zonas de estudio, para valorar el hueso nativo de la calota, y se utilizó un área de 0,5 cm de lado.
- Las otras dos zonas se eligieron dentro de los cilindros de estudio, utilizándose un área de 0,25 cm de lado.

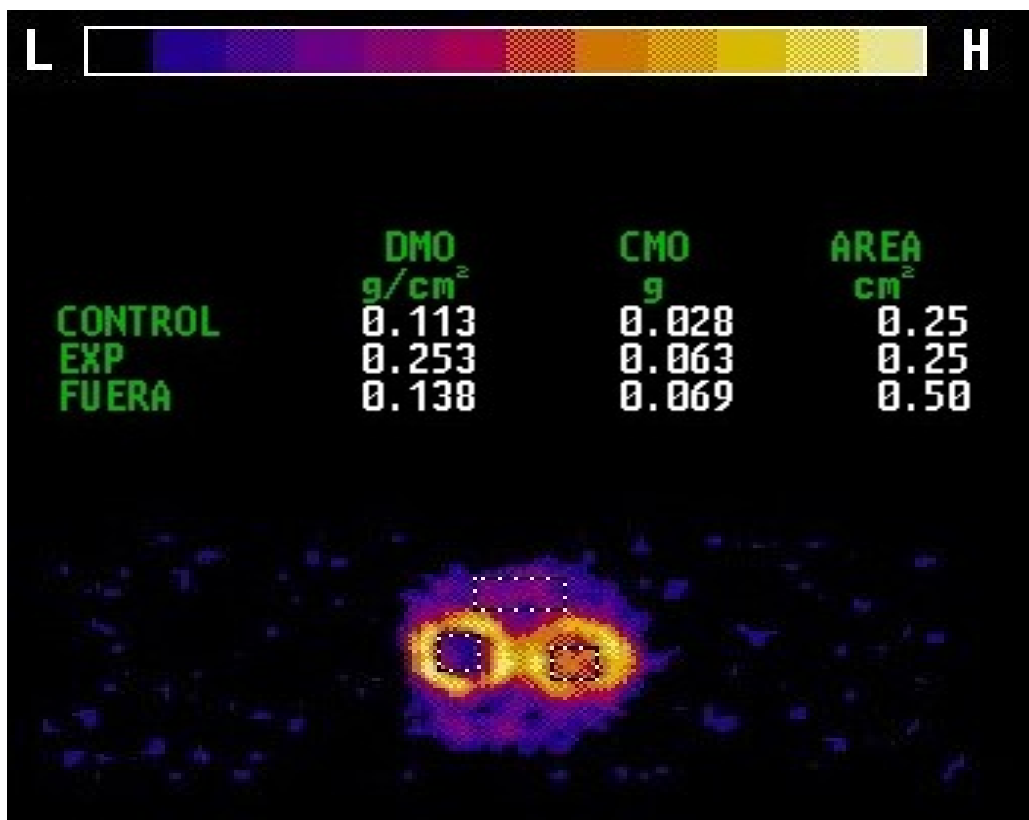


Fig 21. Imagen densitométrica de uno de los casos analizados.

4.2.6. *Tratamiento estadístico de los resultados*

Para finalizar se procedió a la elaboración de los resultados y el análisis estadístico de los mismos. Una vez obtenidos los datos del área de hueso neoformado y de Bio-Oss[®] remanente se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) mediante el programa Statgraphics 5.0.

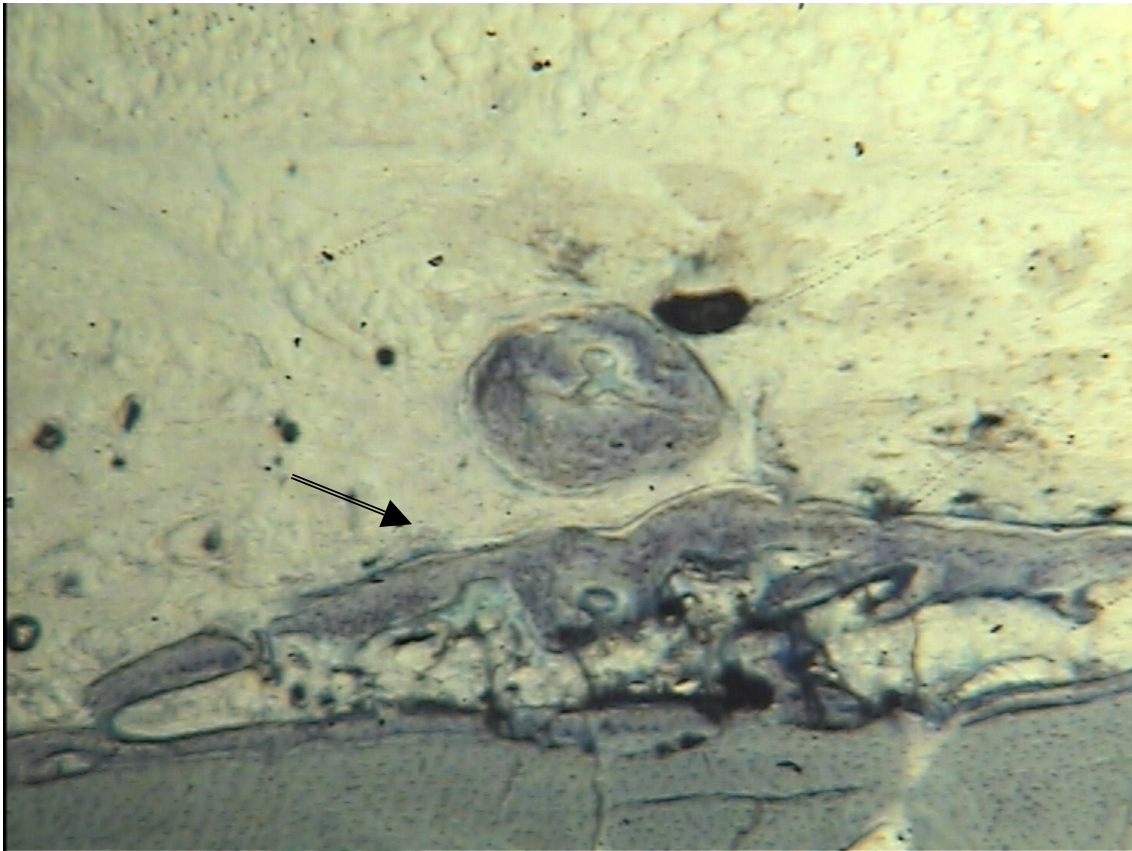
5. RESULTADOS

5.1. *Estudio Histológico. Morfometría*

1. Grupo control

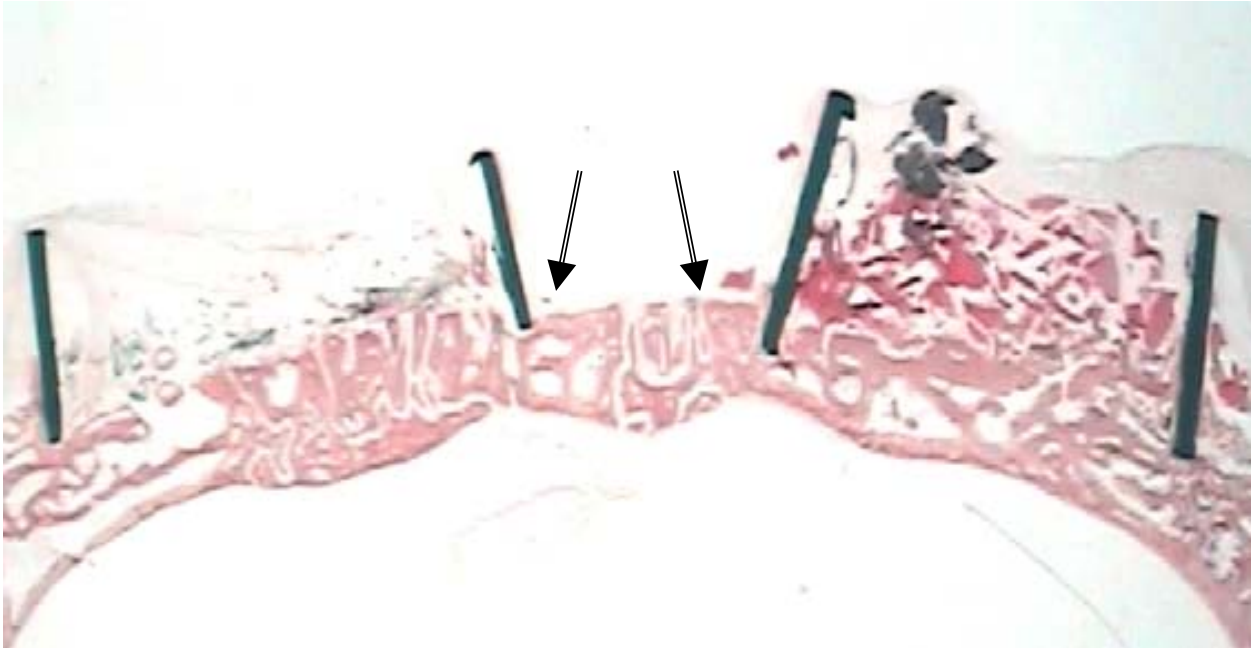
C-1. Cilidro sin biomaterial (control -): Se observó escasa actividad de neoformación (figura 22), con algunas trabéculas jóvenes, cortas y aisladas cercanas a la superficie externa de la cortical. En algún caso la trabécula está unida a la cortical. No se observan osteoblastos ni osteoclastos. En el diploe se diferencian las corticales externa e interna delgadas, separadas por una zona de hueso trabecular. Las zonas donde existe cierta actividad neoformativa parecen estar asociadas a los sitios donde la erosión de la cortical fue más intensa cuando se realizó la cirugía. En este grupo se observó un porcentaje de hueso neoformado de un $5,65 \pm 1,01$.

Fig 22. Grupo control. Escasa neoformación ósea en íntimo contacto con la cortical del hueso parietal. Azul de Toluidina (20x)



En zonas intercilindro donde no se erosionó la cortical no se han observado signos de neoformación ósea (figura 23).

Fig 23. Se puede apreciar la zona intercilindros sin signos de neoformación ósea. Hematoxilina-Eosina (6x)



C-2. Cilindro con Bio-Oss® (control +): Se observó una gran cantidad de partículas de Bio-Oss® repartidos por todo el área de la muestra teñidos pálidamente por la hematoxilina, con un tono verdoso en las preparaciones de tricrómico de Masson y con un aspecto grisáceo en las preparaciones de Azul de Toluidina. Las partículas de Bio-Oss® presentan lagunas vacías de osteocitos, sin embargo, los bordes lisos y claramente artificiales de las partículas lo diferencian de los fragmentos de trabéculas óseas que pudiera haber a su alrededor, así como por la no existencia de osteocitos en el interior de las lagunas, como sí se observan en las trabéculas neoformadas (figuras 24 y 25) . En este grupo se observó un porcentaje de hueso neoformado de un $11,73 \pm 2,36$, siendo el área de Bio-Oss® remanente un $37,19 \pm 5,45$ y el área de hueso neoformado + Bio-Oss® remanente un $48,85 \pm 10,01$.

Fig 24. Grupo Bio-Oss. Detalle de los contornos lisos del Bio-Oss (verde).Masson (20x)

a) contornos lisos del Bio-Oss b) trabécula neoformada c) osteocitos

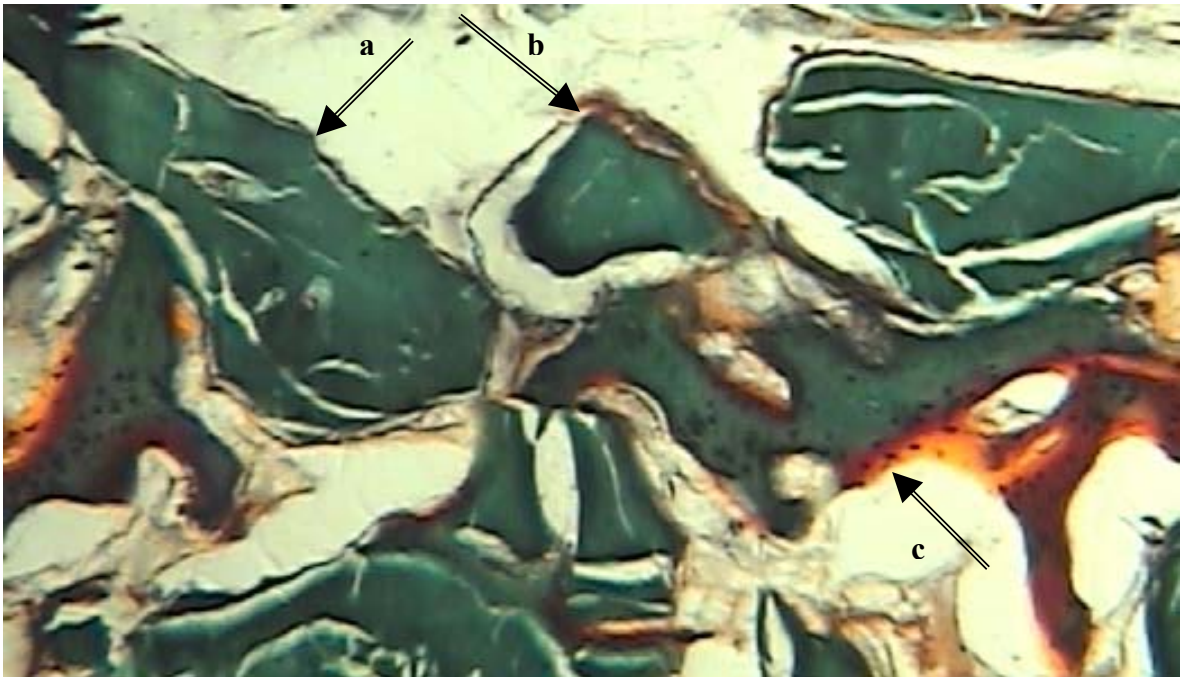
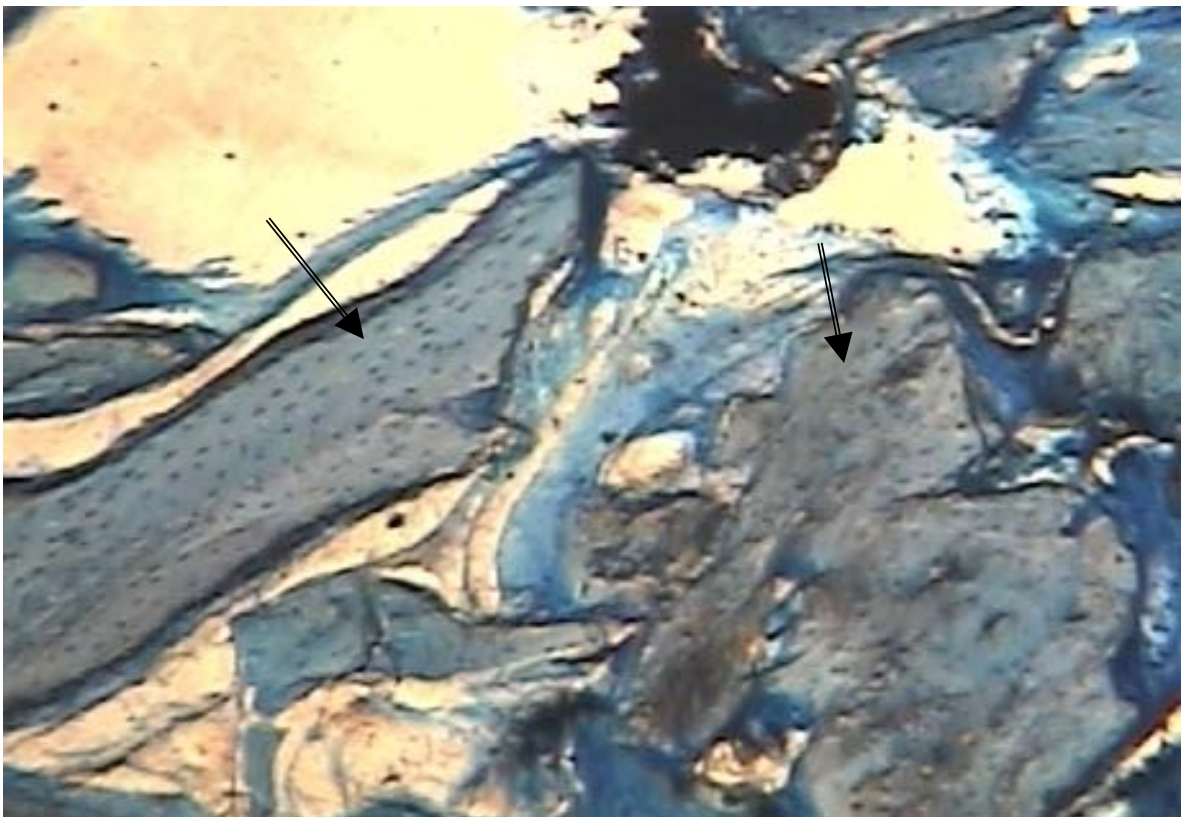
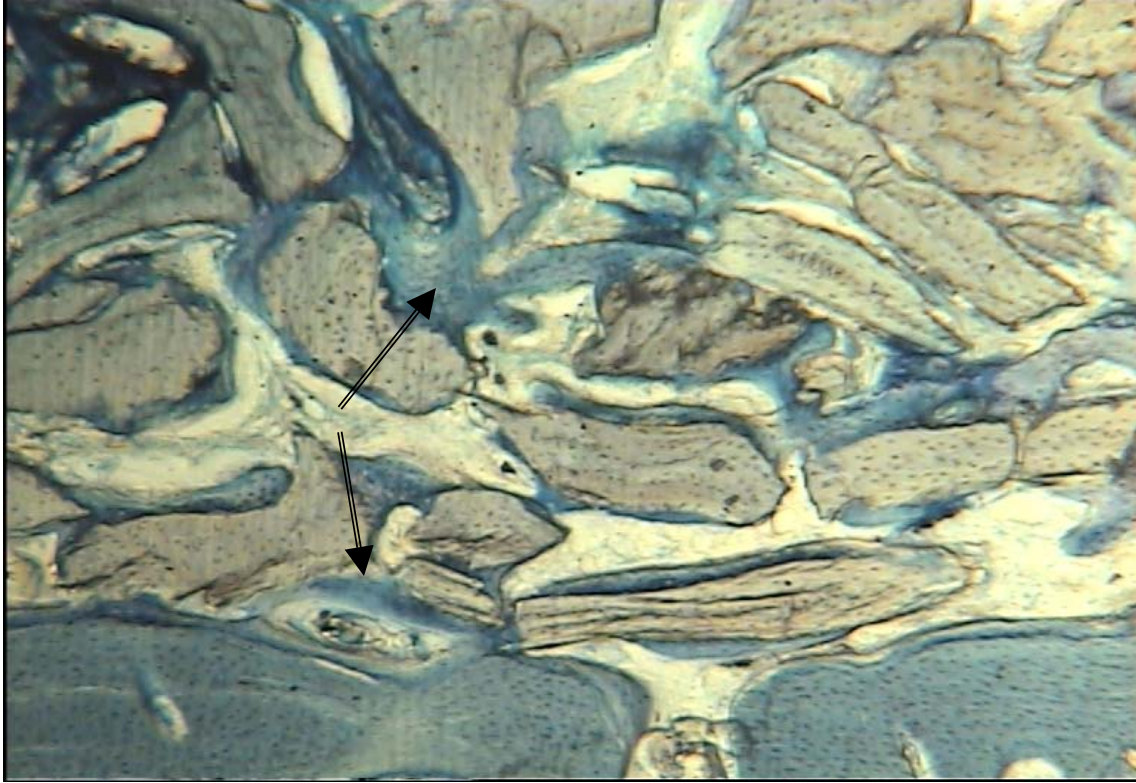


Fig 25. Grupo Bio-Oss. Lagunas osteocíticas en el interior del Bio-Oss (gris). Azul de Toluidina (20x)



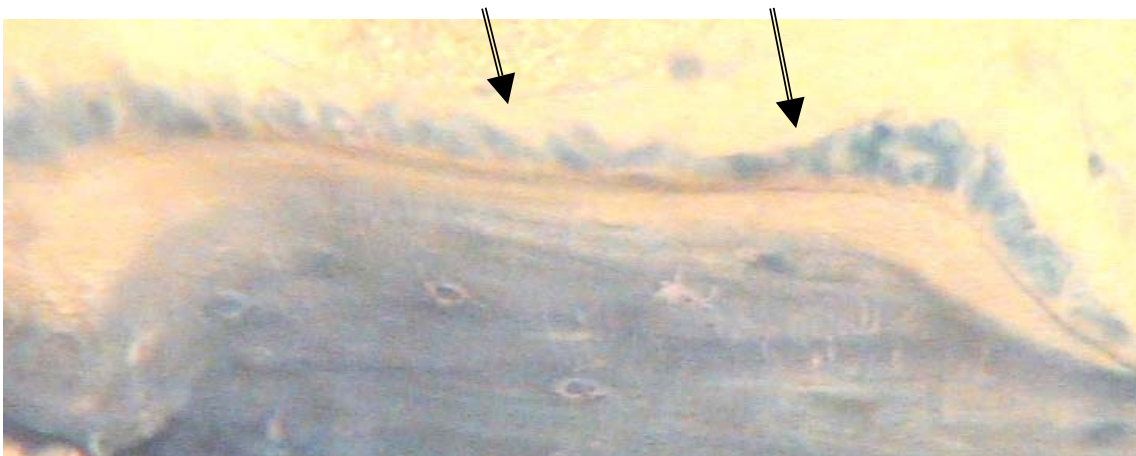
Algunas de las partículas especialmente las más cercanas a la superficie externa de la cortical aparecieron rodeadas de trabéculas óseas (figura 26).

Fig 26. Grupo Bio-Oss. Tejido neoformado cercano a la superficie externa de la cortical. Azul de Toluidina (20x)



En estas trabéculas se aprecia actividad osteoblástica y gran cantidad de tejido osteoide en la zona de neoformación trabecular (figura 27).

Fig 27. Grupo Bio-Oss. Frente osteoblástico de osificación. Azul de Toluidina (40x)

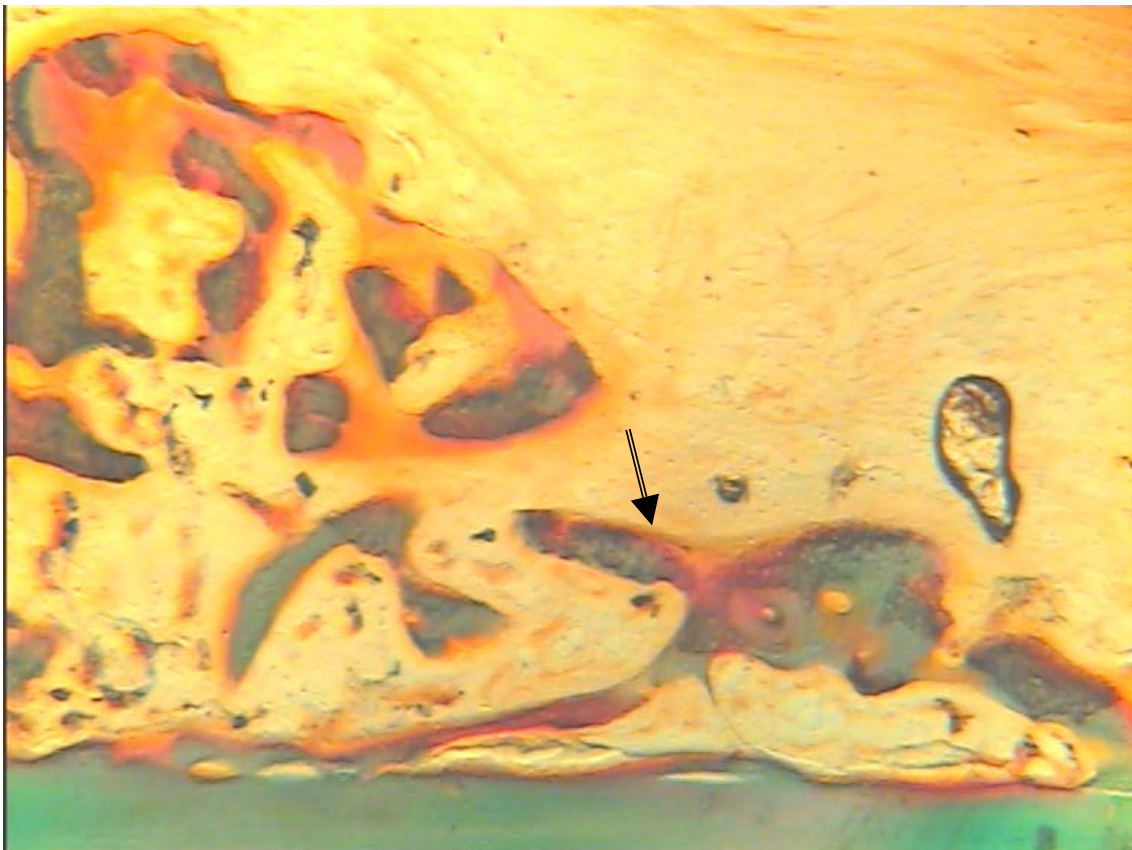


No se evidenciaron signos de reabsorción osteoclástica del biomaterial. Se observó regeneración ósea desde la superficie externa de la cortical, hasta 1/3 de la altura del cilindro aproximadamente. La apariencia general en este grupo sugirió que el Bio-Oss® se comporta como material osteoconductor.

2. Grupo experimental

E-1. Cilindro con PRP: Se encontraron trabéculas aisladas y otras unidas a la superficie externa de la cortical, aparentemente en mayor número que en los cilindros no tratados del grupo control. En algunas preparaciones se observó actividad osteoblástica, mientras que en otras no se observó ninguna respuesta de neoformación (figura 28). En este grupo se observó un porcentaje de hueso neoformado de un $6,30 \pm 1,89$.

Fig 28. Grupo PRP. Se aprecia cierta actividad osteoblástica en relación con la superficie externa de la cortical. Masson (20x)



E-2. Cilindro con PRP+Bio-Oss®: Se observó el mayor grado de regeneración ósea de todos los grupo experimentales, evidenciándose numerosas trabéculas óseas entre el biomaterial y actuando como puentes de unión entre unas trabéculas y otras (figura 29). En este grupo se observó un porcentaje de hueso neoformado de un $21,23 \pm 3,57$, siendo el área de Bio-Oss® remanente un $34,67 \pm 3,74$ y el área de hueso neoformado + Bio-Oss® remanente un $55,90 \pm 4,85$.

Fig 29. Grupo PRP+Bio-Oss. Trabéculas de hueso neoformado unidas unas con otras entre las partículas de biomaterial. Azul de Toluidina (20x)

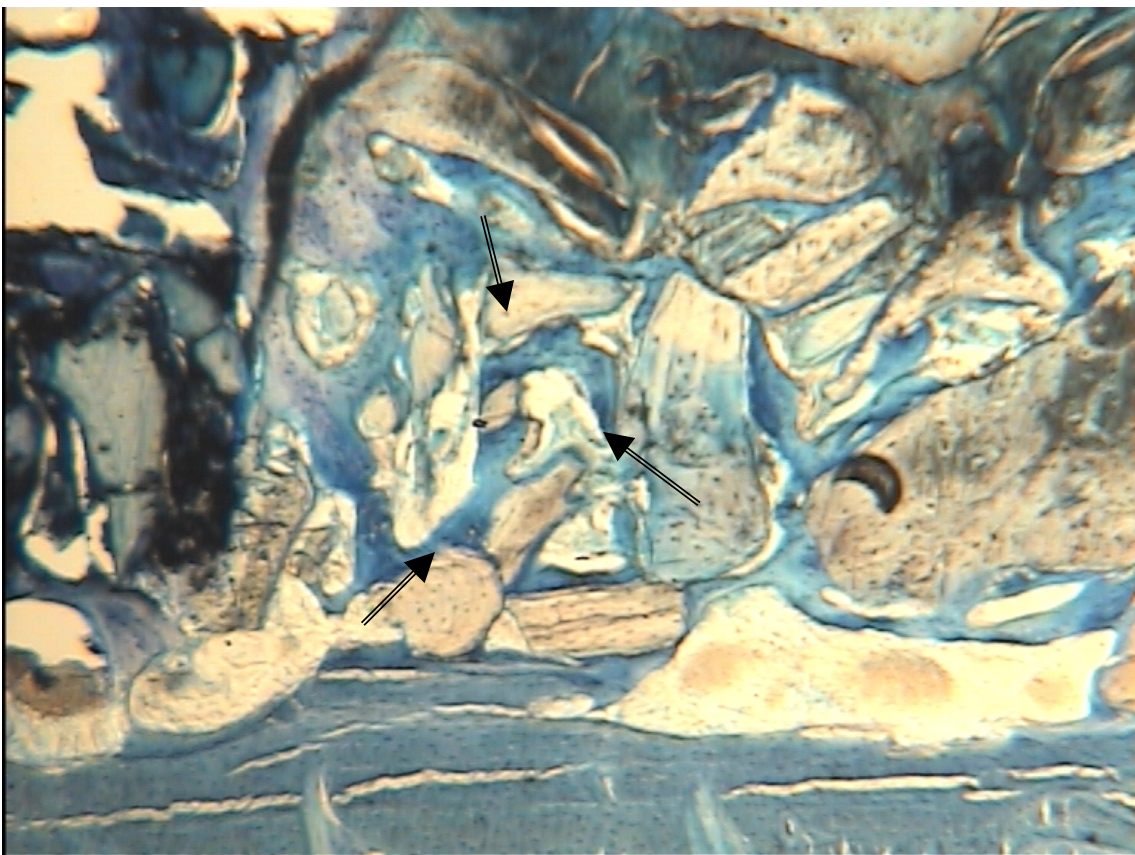
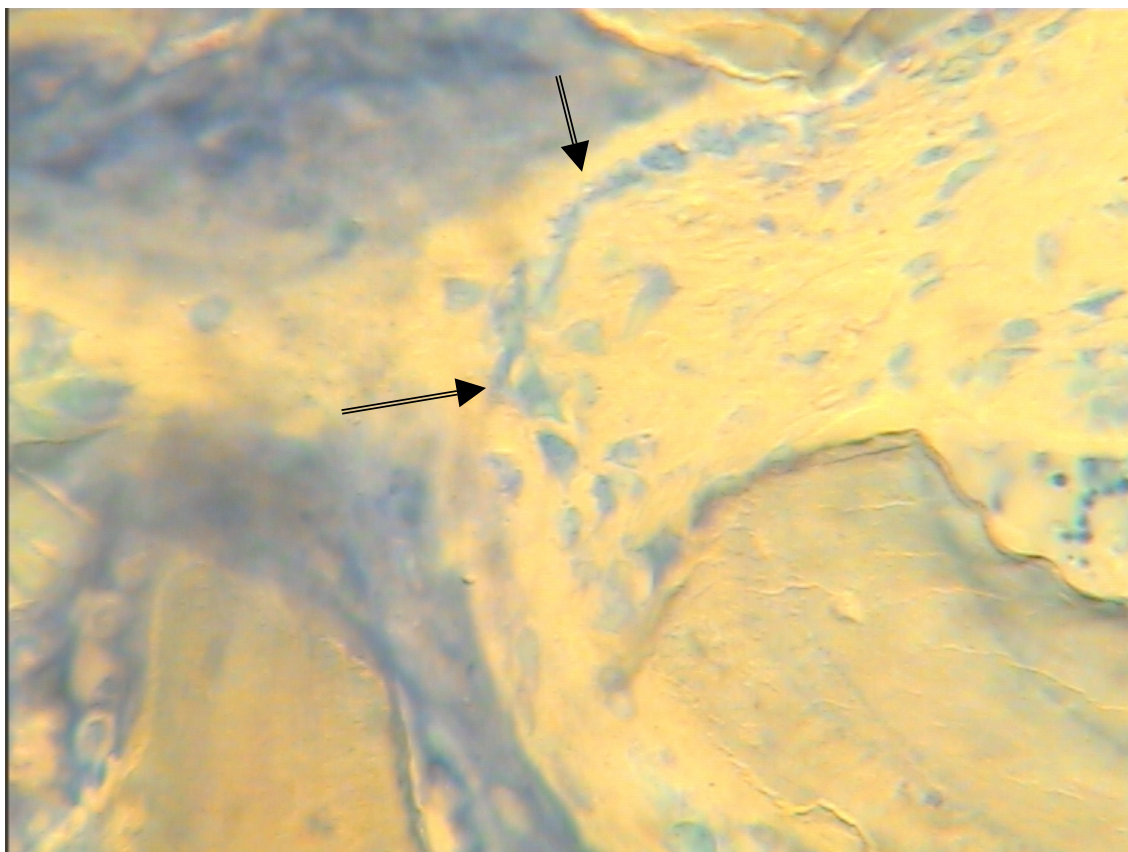


Fig 30. Grupo PRP+Bio-Oss. Hilera de osteoblastos. Azul de Toluidina (40x)



De forma resumida podemos ver en la tabla XIV el área media de hueso neoformado en cada uno de los grupos así como el análisis estadístico de esta variable que resultó ser estadísticamente significativa entre los grupos control+ (Bio-Oss) y PRP+Bio-Oss respecto a los grupos control – y PRP (figura 31). Además en el grupo PRP+Bio-Oss el área de hueso neoformado fue estadísticamente significativa respecto al grupo control + (Bio-Oss).

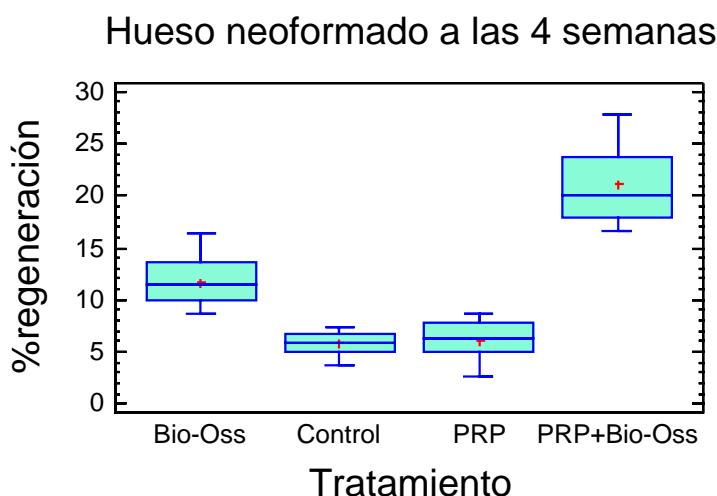
Tabla XIV. Media y desviación típica del área de hueso neoformado en cada grupo experimental

Grupos experimentales	Área de hueso neoformado (%)	Desv típica (%)
Control –	5,65	1,01
Control + (Bio-Oss)	11,73*	2,36
PRP	6,30	1,89
PRP+Bio-Oss	21,23**	3,57

* Estadísticamente significativo respecto al grupo control y grupo PRP ($p < 0.05$).

**Estadísticamente significativo respecto al grupo Bio-Oss ($p < 0.05$).

Fig 31. ANOVA del porcentaje de hueso neoformado en cada grupo experimental



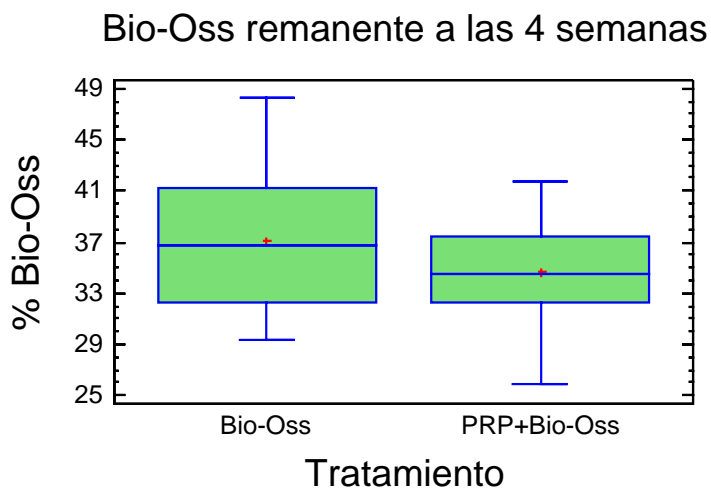
En la tabla XV podemos ver el área media de Bio-Oss remanente tanto en el grupo control+ (Bio-Oss) como en el grupo PRP+Bio-Oss, seguido del análisis estadístico de esta variable, en donde no se observaron diferencias significativas (figura 32).

Tabla XV. Media y desviación típica del porcentaje de Bio-Oss remanente en cada grupo experimental

Grupos experimentales	Área de Bio-Oss remanente (%)	Desv típica (%)
Bio-Oss	37,19	5,45
PRP+Bio-Oss	34,67	3,74

Las diferencias no son estadísticamente significativas ($p < 0.09$).

Fig 32. ANOVA del porcentaje de Bio-Oss remanente en cada grupo experimental.



En la tabla XVI podemos ver el área media de hueso neoformado + Bio-Oss remanente tanto en el grupo control+ (Bio-Oss) como en el grupo PRP+Bio-Oss, seguido del análisis estadístico de esta variable, que resultó ser estadísticamente significativa (figura 33).

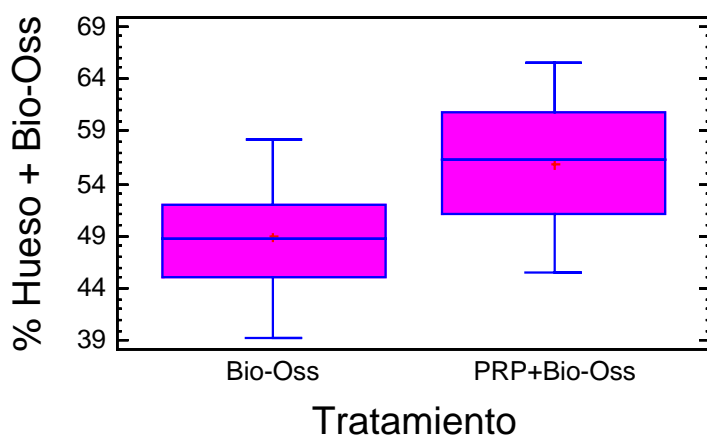
Tabla XVI. Media y desviación típica del porcentaje de hueso neoformado+Bio-Oss remanente en cada grupo experimental

Grupos experimentales	Área de hueso+Bio-Oss	Desv típica (%)
Bio-Oss	44,85	10,01
PRP+Bio-Oss	55,90*	4,85

*Estadísticamente significativo respecto al grupo Bio-Oss ($p < 0.05$).

Fig 33. ANOVA del porcentaje de hueso neoformado + Bio-Oss a las 4 semanas en cada grupo experimental

Hueso neoformado + Bio-Oss a las 4 semanas



5.2. Estudio densitométrico.

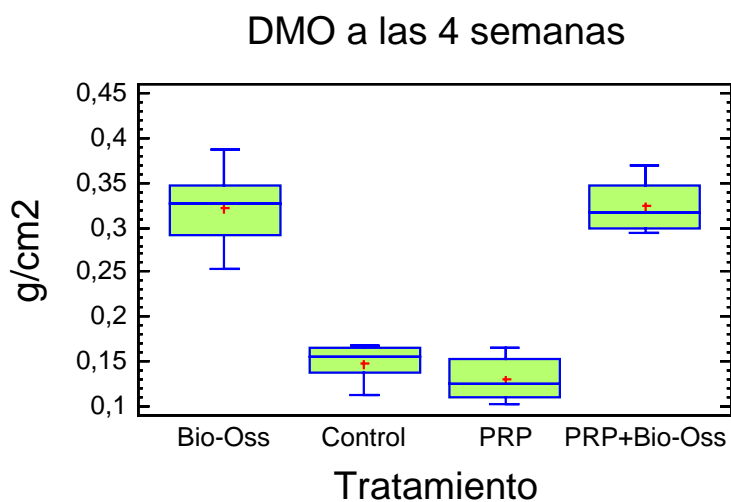
Existen diferencias significativas entre los grupos a los que se les añadió Bio-Oss respecto del grupo control y del grupo PRP que no se les añadió Bio-Oss ($p < 0.05$) ($p < 0.0001$). Entre los grupos a los que se les añadió Bio-Oss no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.9$) (figura 34).

Tabla XVII. Media y desviación típica de la DMO en cada grupo experimental

Grupos experimentales	DMO (g/cm^2)	Desv típica (g/cm^2)
Control	0,148	0,022
Bio-Oss	0,317*	0,051
PRP	0,128	0,024
PRP+Bio-Oss	0,322*	0,029

* Estadísticamente significativo respecto al grupo control y grupo PRP ($p < 0.05$).

Fig 34. ANOVA de la DMO a las 4 semanas en cada grupo experimental



6. DISCUSIÓN

En este trabajo se evalúa el efecto que produce la administración de PRP en procedimientos de regeneración ósea vertical, en condiciones de metabolismo óseo alterado como es el caso de la osteoporosis.

ELECCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

En nuestro trabajo el modelo experimental de osteoporosis que hemos empleado ha sido el propuesto por Mori et al (1997) (10) y modificado por Tresguerres (11) que utiliza tras la ovariectomía una dieta hipocálcica de 0,07 en vez del 0,15 y durante 6 semanas en lugar de 4.

Conseguimos la osteoporosis experimental mediante la realización de una ovariectomía y empleando una dieta del 0,07% de calcio diario durante 6 semanas, para posteriormente proceder a la inserción de los anillos de titanio, que estabilizan los biomateriales con los que hemos analizado la regeneración ósea vertical.

Recientemente, Bosch ha establecido los siguientes criterios de idoneidad en los defectos óseos experimentales usados como modelos de regeneración ósea (303,304): el defecto óseo experimental no debe ser menor que el defecto de tamaño crítico para ese animal; los animales deben ser baratos, accesibles, fáciles de manejar y anestésicos; el hueso estudiado debe incluir una parte de cortical y otra medular; se debe asegurar la estabilidad mecánica en el lecho de regeneración; el riesgo de fractura debe ser mínimo; y debe ser posible hacer un seguimiento adecuado de la evolución del defecto, pudiendo confirmar la regeneración ósea tanto histológica como radiográficamente.

Posiblemente el criterio de defecto crítico sea el más controvertido de todos, en cuanto a su definición y los tamaños considerados como críticos en cada animal de experimentación. Un defecto de tamaño crítico ha sido definido como el defecto intraóseo más pequeño, en un hueso determinado de una especie concreta que no regenera espontáneamente durante la vida del animal (305) (Schmith). El intento de regeneración ósea resultará en la formación de tejido fibroso, en vez de hueso, aunque siempre existe cierta cantidad de regeneración ósea desde los bordes del defecto.

El tamaño del defecto crítico en calota de conejo es controvertido, mientras algunos autores consideran este tamaño de 15 mm (306), nosotros en anteriores estudios hemos comprobado como en defectos de 9 mm no se producía regeneración espontánea a las 8 semanas (307).

Se eligieron cilindros de titanio de 10 mm de diámetro y 4 mm de altura para estabilizar el injerto, de tal manera que impediría la difusión de los biomateriales utilizados algunos en forma de gel, al lado contralateral.

Nuestro modelo podría ser considerado como un defecto de tamaño crítico tanto por la extensión del defecto en superficie (10 mm de diámetro), como por el propio objetivo de valorar la regeneración ósea vertical, circunstancia que nunca se produciría espontáneamente.

De acuerdo con Bosch (304), la calidad y cantidad de hueso que se forma en un defecto óseo depende fundamentalmente de los siguientes factores: la especie animal, edad, estabilidad del defecto, localización anatómica del defecto, tipo de hueso, presencia de periostio y presencia de duramadre.

El conejo como animal de experimentación nos resulta adecuado porque el proceso de formación y remodelado óseo es tres veces más rápido que en los humanos. (Roberts, 1988)(308). En humanos el proceso de remodelado dura entre 6 y 9 meses; este período de tiempo de tiempo se conoce como sigma. Sigma para el perro dura 3 meses y para el conejo 6 semanas.

La localización del defecto en la calota craneal permite estudiar el comportamiento del hueso de origen membranoso. Mientras que en la osificación intramenbranosa se forma hueso directamente, sin intermediarios cartilaginosos, en la osificación endocondral primero se forma cartílago y luego hueso. Se eligió la calota craneal porque el origen del hueso es intramenbranoso, del mismo modo que los huesos de los maxilares, lo que es importante a la hora de extrapolar los resultados del modelo experimental elegido.

Debido al tamaño del cráneo del conejo hemos elegido estabilizar cilindros de titanio de 10 mm de diámetro, puesto que un diámetro más pequeño podría facilitar la regeneración de forma espontánea y sería poco útil para evaluar la influencia positiva que pudieran tener los materiales de estudio. También hemos descartado cilindros de titanio de mayor diámetro puesto que los cilindros deberían estabilizarse en la línea media, invadiendo por tanto la sutura sagital. El crecimiento de tejidos blandos a partir de ésta puede por sí sólo inhibir la regeneración ósea, de acuerdo con los estudios de Slotte. (303).

El tamaño que hemos elegido permite estabilizar los cilindros de titanio de forma bilateral en los huesos parietales separados por la sutura sagital, de forma que cada animal sea su propio control.

Además existen diversos estudios animales que utilizan el modelo de la calota craneal para estudiar la regeneración de hueso membranoso (303,304,309).

El conejo presenta por otra parte unas condiciones óptimas para ser utilizado como modelo experimental ya que son animales baratos, accesibles, fáciles de manejar y anestésiar.

Aunque teóricamente el defecto óseo debe permanecer sin regenerar toda la vida del animal, a efectos prácticos es suficiente que no regenere durante la duración del estudio. Si el estudio tiene una duración demasiado breve, puede no dar tiempo a que se exprese completamente la regeneración ósea espontánea. La elección de 4 semanas como punto final para evaluar la regeneración ósea en nuestro estudio vino dada por varios factores.

Aunque la acción del PRP se supone local y limitada en el tiempo, una de nuestras suposiciones era que la aplicación puntual de PRP podría desencadenar una serie de eventos que darían lugar finalmente a regeneración ósea. Esto resultaría compatible con el modelo de formación ósea en cascada en el cual el inicio de la mitogénesis y la diferenciación celular de los precursores osteoblásticos da lugar a un proceso autopropagante en el cual otras moléculas necesarias para el mantenimiento de

la respuesta osteogénica son secretadas por estas células según van multiplicándose y diferenciándose (310).

El tiempo empleado en el modelo de estudio era amplio para evaluar el efecto del PRP en la regeneración ósea en conejos de acuerdo con un estudio de Weibrich según el cual el efecto del PRP dura al menos 4 semanas (311).

En otro estudio realizado por nosotros pudimos constatar el efecto que tiene el PRP sobre los mecanismos regenerativos del hueso, en las fases iniciales de cicatrización. De este modo el PRP actuó acelerando la regeneración ósea en las primeras semanas, resultando estadísticamente significativo a las 4 semanas respecto al control. Sin embargo a partir de la cuarta semana se produjo una ralentización en el crecimiento hasta el punto de ser superado mínimamente por el grupo control a las 8 semanas (307). Resultados similares han sido referidos en otros estudios. (Fontana, Roldan) (312,313).

El efecto del PRP en la expresión de las proteínas de la matriz ósea fue identificado principalmente en las primeras fases de la regeneración ósea por Thornwarth, (314) confirmando los resultados obtenidos mediante evaluación histológica e histomorfométrica por Schlegel, donde se observó un incremento significativo en la formación ósea con el uso de PRP a las 2 semanas (315).

Puesto que existe una cierta controversia sobre la capacidad de reabsorción del Bio-Oss, otro de nuestros objetivos era determinar la capacidad de reabsorción del Bio-Oss, con o sin PRP, considerando suficiente 4 semanas para observar indicios de la reabsorción del biomaterial. Se había considerado que la estimación del área de Bio-Oss remanente podría ser un índice indirecto de la actividad osteoclástica y dilucidar de este modo si el PRP favorece o inhibe la reabsorción osteoclástica del Bio-Oss.

Los estudios de Tresguerres confirman que el conejo reacciona ante el trauma quirúrgico tras la inserción de láminas de titanio en tibia, formando trabéculas sobre el implante a los 15 días y cerrando el defecto óseo a las 3 semanas (296).

Hämerle considera que la identificación de los bordes originales de defectos óseos de 15 mm de diámetro en el cráneo del conejo es difícil después de tres semanas, por lo que utiliza marcadores de aposición ósea como la tetraciclina, para la identificación del hueso neoforado (316), sin embargo en nuestro estudio la introducción de los cilindros de titanio permite la clara identificación del área de estudio.

Pallesen sin embargo sugiere que tras 4 semanas, el tricrómico de Goldner permite distinguir claramente el borde del defecto inicial (317).

Schmith observa a las 4 semanas la existencia de vasos sanguíneos neoforados y nueva formación de hueso asociado a la neoangiogénesis, en un estudio de regeneración ósea vertical mediante membrana reabsorbible en forma de cúpula en calota de conejos (318).

Estos estudios sugieren que 4 semanas pueden ser suficientes para el estudio de procedimientos de regeneración ósea en calota de conejos.

CONSIDERACIONES PARTICULARES DEL PRP

El PRP es un concentrado de plaquetas rico en factores de crecimiento de origen autólogo y que es obtenido por centrifugación (319).

La definición de lo que actualmente conocemos como PRP no deja de estar sujeto a controversias entre distintos autores así; para Marx, la definición de lo que constituye PRP y PPP difiere de lo que considera Landersberg, para la que el PRP sería “la mitad superior de la preparación” y PPP la “mitad inferior de la preparación”. Marx considera que actualmente el PRP es mucho menos que la mitad de la fracción plasmática, ya que sólo representa el 20% del total de la fracción plasmática como verdadero concentrado de plaquetas. Un preparado de PRP debe concentrar aproximadamente 400%, es decir 4 veces más que los niveles basales de sangre periférica medidos con un contador Coulter. Según Marx cualquier concentrado menor que esto es PRP diluido en PPP (320).

El PRP obtenido de una preparación autóloga de concentrado de plaquetas contiene muchos factores de crecimiento incluyendo PDGF, TGF β ₁, TGF β ₂ e IGF-I. PDGF parece tener numerosos efectos positivos en la cicatrización de heridas incluyendo la mitogénesis y la angiogénesis, además de favorecer la liberación de otros factores de crecimiento. Los diferentes componentes del PRP trabajan de forma sinérgica para incrementar la proliferación y diferenciación de células endoteliales humanas y células madre mesenquimales, actuando como un estímulo en la cicatrización ósea (Killian 2004) (321).

Sin embargo la pérdida de bioactividad de los factores de crecimiento una vez liberados tras la degranulación de los gránulos alfa de las plaquetas puede ser problemático si el almacenamiento del PRP supera la 48 horas antes de su uso (322).

Diversos estudios sugieren que las plaquetas incrementan significativamente la proliferación de células óseas de individuos adultos, corroborando la hipótesis de que las plaquetas pueden actuar como reguladores locales en la reparación de fracturas y regeneración ósea, posiblemente debido a un efecto sinérgico de todos los factores de crecimiento existentes en el concentrado plaquetario (321,323,324) (Gruber, Soffer).

Aunque el PRP y los concentrados de plaquetas han sido utilizados para promover la cicatrización ósea en cirugía ortopédica y maxilofacial, los mecanismos exactos subyacentes a nivel celular no se conocen totalmente. Los fenómenos químicos que suceden durante la coagulación sanguínea y la inflamación en las primeras fases de la cicatrización ósea, como la quimiotaxis de precursores de osteoblastos, proliferación y diferenciación de células osteocompetentes, así como la expresión de proteínas morfogenéticas no son del todo conocidos.

La necesidad de un sistema de transporte para vehiculizar los factores de crecimiento es ampliamente aceptada por numerosos autores, aunque probablemente no son necesarios para todos igual. Las BMP precisan de matrices de colágeno, hidroxiapatita (con la que tienen especial afinidad), hueso liofilizado o matrices polisacáridas (325). Los TGF- β pueden ser administrados en un abanico más amplio con similar eficacia (326). Los FGF tienen altísima afinidad por la heparina. El PRP al activarse se vehiculiza en forma de gel, al quedar contenido en un coágulo de fibrina.

Diversos estudios coinciden en que la administración en forma líquida de los factores de crecimiento, especialmente cuando se trabaja en un lecho quirúrgico abierto, favorece que los factores de crecimiento se diluyan en el tejido y sean atacados por proteasas que los inactiven (327,328). Con un vehículo apropiado, el factor de crecimiento mantendría una concentración ideal en el tejido para que se produzca una estimulación celular de duración adecuada.

El efecto del PRP en el lugar de administración se prolonga 5 días, pero sus efectos sobre la aceleración de la regeneración ósea se pueden observar hasta 4 semanas después de su administración.(329, 209) (Weibrich-Marx)

El PRP se está utilizando actualmente de muchas maneras:

PRP aislado. El uso del PRP aislado se lleva utilizando varios años en forma de coagulo estable de fibrina favoreciendo la liberación de los factores de crecimiento en el lugar de administración, aunque existen pocos estudios que evalúen su aplicación de forma aislada.

PRP+Bio-Oss. El Bio-Oss es un material que se usa habitualmente en la práctica clínica, especialmente en procedimientos de elevación de seno maxilar para colocación de implantes, aunque también se utiliza para el aumento del reborde alveolar o simultáneamente a la colocación de implantes, comportándose principalmente como material osteoconductor. (191,191,193,194). Los métodos que aceleraran y mejoraran la integración del material injertado serían de gran utilidad para reducir el tiempo de tratamiento, así como de aumentar las posibilidades de éxito del procedimiento. El PRP por su acción mitogénica y quimiotáctica podría ser un buen complemento a la acción osteoconductor que se ha descrito para el Bio-Oss.

Otros. El PRP se ha combinado también con muchos otros biomateriales con distintos resultados.

Existen muchos autores que han utilizado el PRP combinado con hueso autógeno con excelentes resultados. Tanto los resultados de Whitman como de Marx

demuestran que el uso de PRP+hueso autógeno incrementa la capacidad osteogénica y la calidad de hueso neoformado. Anitua utiliza PRP+hueso autógeno con resultados significativamente mejores, desde el punto de vista de la regeneración y maduración ósea con respecto al grupo control y exento de riesgos para el paciente. (208,209,210).

Ziv Mazor y cols, (330) evalúan la utilización de PRP+hueso autógeno (30%)+Bio-oss (70%) en elevaciones de seno sobre 105 pacientes que presentaban un reborde óseo residual de menos de 5mm en la región posterior del maxilar. Los autores observan en el uso del PRP una aceleración de la regeneración ósea, un mejor manejo del injerto y una mejor cicatrización de los tejidos blandos. El tiempo de espera manejado por los autores para realizar la segunda fase en implantes colocados en senos aumentados era de 9 meses antes del uso del PRP. La aplicación del PRP reduce el tiempo de espera en 3 meses.

Kassolis y cols, (331) presentan casos de utilización de PRP+FDDBA en procedimientos de elevación de seno, y sugieren que su uso permite una disminución en los tiempos de inserción implante y carga del implante, aunque en su estudio carece de controles.

Kitoh propuso la utilización de PRP+MSCs (células mesenquimales) durante distracción osteogénica en 2 pacientes con acondroplasia y en uno con pseudoartrosis de tibia, concluyendo que parecía ser una forma de terapia celular segura y mínimamente invasiva que podría disminuir el tiempo de los tratamientos debido a la aceleración en la regeneración ósea conseguida (332).

Basa sugiere también que la utilización de PRP+TCP disminuye los tiempos de cicatrización en procedimientos regenerativos (333).

CONCENTRACIÓN DEL PRP

Una importante razón para mejorar los métodos para aislar el PRP es el uso potencial de los factores de crecimiento autógenos de las plaquetas. Sin embargo no existe consenso en lo que podríamos denominar “concentración óptima del concentrado plaquetario” a pesar de que existen estudios comparativos entre los distintos sistemas de

producción de PRP. En tres interesantes artículos Weibrich evaluó la capacidad de concentrar plaquetas y factores de crecimiento con diversos sistemas de producción de PRP. Se evaluaron la plamaféresis de banco de sangre (Blood Bank), Curasan Kit, Smart PreP, Friadent, PCCS y PRGF (334, 335, 336,337).

	[P/ μ l] Plaquetas	[L/ μ l]Leucocitos	PDGF-AB (ng/ml)	TGF-b1 (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)
Blood Bank	1,434,300	160	133,59	268,65	85,37
Curasan Kit	908.500	30,130	233,70	95,02	101,0
Smart PreP	1,227,890	19,261	208,85	77,2	91,4
Friadent-Schütze	1,440,500	21,691	251,6	198,8	72,8
PCCS system	2,232,500	15,300	251,8	467,1	91,0
Cursan Kit	1,140,500	33,150	314,1	79,7	69,5
PRGF	513,630	65	47	73	

Tabla XVIII. Concentración de plaquetas y factores de crecimiento con diferentes sistemas de obtención.

Los análisis sugieren que mientras para el PRP-Blood Bank (BB), existe una mayor concentración de plaquetas, para el sistema Curasan existe un mayor recuento de leucocitos. El alto recuento de leucocitos y de PDGF en este sistema fue inesperado, y se sospecha otra fuente productora de PDGF, posiblemente proveniente de los leucocitos. Por otro lado se observa una relación directa entre el concentrado de plaquetas y el recuento de TGF- β , puesto que altas concentraciones de plaquetas producen altos niveles de TGF- β mientras que concentraciones más bajas de plaquetas producen niveles más bajos de TGF- β . Sin embargo respecto al PDGF algunos provienen de plaquetas y otros deben provenir de leucocitos. La concentración de IGF-I fue similar en ambos procedimientos (334).

El sistema Friadent concentra mayor número de plaquetas y factores de crecimiento que el Smart, sin embargo el autor considera el Smart PReP mejor sistema que el Friadent basándose en su facilidad de manejo y tiempo de preparación (336).

El sistema PCCS (3i) concentra mayor número de plaquetas que el el sistema Curasan. Esto se relaciona con una mayor concentración de TGF- β ($p < 0.001$) e IGF-I aunque este último de forma menos significativa ($p < 0.02$). Por otro lado la mayor concentración de leucocitos obtenida con el sistema Curasan se relacionó con mayores niveles de PDGF-AB ($p < 0.001$) (335).

Un artículo reciente publicado en 2005 por Weibrich sugiere que el sistema PRGF concentra una menor cantidad tanto de PDGF-AB como de TGF- β en comparación con el sistema PCCS (3i). Los resultados estadísticos fueron altamente significativos ($p < 0.001$ para el TGF- β 1 y $p < 0.01$ para el PDGF-AB) (337).

Existe una amplia variabilidad en las concentraciones obtenidas de factores de crecimiento, en función del sistema elegido según los estudios de Weibrich, aunque son necesarios estudios posteriores que determinen que estas variaciones en las concentraciones de factores de crecimiento tengan clínicamente un efecto biológico diferente.

Thornwarth (314) compara el potencial regenerativo del hueso autógeno y del colágeno bovino (Collos®) tanto de forma aislada como en combinación de PRP en dos concentraciones diferentes PRP *ad modum* Curasan™ y PRP *ad modum* 3i™ mediante evaluación inmunohistoquímica. El uso del modo 3i obtuvo mayor concentración de plaquetas que el método Curasan, de acuerdo con los estudios de Weibrich (338).

Teóricamente los niveles de factores de crecimiento en el PRP, se supone que dependen del número de plaquetas concentradas. Sin embargo los datos obtenidos de otro estudio de Weibrich no demuestran una correlación estadísticamente significativa entre concentrado de plaquetas y número de factores de crecimiento. Esto probablemente se deba a una alta variación de las células en la producción o almacenamiento de citoquinas y es probable que el número de factores de crecimiento de cada paciente esté influenciado por factores biológicos desconocidos, lo que significa que diferentes individuos necesitarán diferentes concentraciones de plaquetas para conseguir un efecto biológico parecido. Sin embargo no se encontraron diferencias en los niveles de factores de crecimiento en función del sexo y la edad (338).

Por otro lado Zimmerman (339) sugiere, lo contrario, es decir que existe una correlación entre el contenido de plaquetas y la cantidad de factores de crecimiento.

Existen a su vez diferentes protocolos para la obtención del concentrado plaquetario, de acuerdo a cada sistema e incluso a cada autor, así algunos presentan dos centrifugados, otros solamente uno y una amplia variación en cuanto a los tiempos de centrifugado:

	Centrifugado 1 (min) / (rpm)	Centrifugado 2 (min) / (rpm)
Curasan Kit	10 min / 2400 rpm	15 min / 3600 rpm
Smart PreP	6 min / 5600 rpm	6 min / 2400 rpm
Friident-Schütze	10 min / 2400 rpm	15 min / 3600 rpm
PCCS system	3,45 min / 3000 rpm	13 min / 3000 rpm
PRGF	7 min / 1400 rpm	-

Tabla XIX. Protocolos de centrifugado de distintos sistemas

Arpornmaeklong, evaluó la capacidad del PRP en la diferenciación osteogénica en células de hueso medular de rata sugiriendo que una alta concentración de PRP inhibía la diferenciación osteoblástica, que se reflejaba en unos niveles bajos de ALP y de contenido de calcio frente al grupo de BMP-2 y al grupo PPP, al mismo tiempo que incrementaba la proliferación osteoblástica (340).

Posiblemente altas concentraciones de TGF- β inhiban la diferenciación osteoblástica del mismo modo que estimulan la proliferación, según un estudio de Lu en el uso del TGF- β , parece indicar que dosis de 5-10ng/ml inhiben mientras que dosis más bajas 1 ng/ml favorecen la diferenciación observada en altos niveles de ALP y osteocalcina (341).

Sin embargo es posible que el efecto mayoritario del PRP derive de las propiedades del PDGF que es un potente mitógeno. Estudios del efecto del PDGF sobre la diferenciación osteoblástica *in vitro* también indican una reducción en los niveles de ALP (341). El EGF disminuye igualmente los niveles de ALP, mientras que el IGF-I incrementa los niveles de ALP aunque se encuentra en una concentración mucho menor (342).

Una aplicación múltiple de estos factores de crecimiento demuestra efectos sinérgicos en la proliferación celular y la síntesis de proteínas colágenas y no colágenas de la matriz, sin embargo el IGF-I no favoreció niveles altos de ALP en presencia de PDGF y TGF- β_1 (343).

Soffer (324) considera que la exposición del concentrado plaquetario (3×10^8 plaquetas/ml) promueve las funciones proliferativas y quimiotácticas de las células óseas, posiblemente debido a un efecto sinérgico de todos los factores de crecimiento existentes en el concentrado plaquetario, del mismo modo que sugieren otros autores como Gruber en 2002 (323) sobre células de hueso medular humano y Oprea en 2003 (344) sobre hueso medular de ratas adultas. Por otra parte la acción de estos factores de crecimiento provoca un descenso tanto de la actividad de ALP como de la formación de mineral, en concordancia con los resultados de Giannobile 1997 (344). Estos datos sugieren que los componentes solubles contenidos en el concentrado plaquetario pueden afectar al proceso de cicatrización ósea modulando diferentes funciones de las células óseas.

Gruber (323) sugiere, en un estudio *in vitro* sobre la respuesta mitogénica de las células derivadas del hueso trabecular humano a las plaquetas humanas, que las plaquetas incrementan significativamente la proliferación de células óseas de individuos adultos, corroborando la hipótesis de que las plaquetas pueden actuar como reguladores locales en la reparación de fracturas y regeneración ósea a concentraciones en un rango de 2×10^8 a 8×10^6 .

La concentración plaquetaria óptima del PRP todavía no se ha sido descrita, sin embargo Weibrich (329) llega a sugerir que mientras concentraciones por debajo de 1,000,000/ μ l presentan un efecto subóptimo, concentraciones superiores a esa

concentración podrían tener paradójicamente efectos inhibitorios. Nosotros hemos utilizado un PRP que presentaba una concentración media de plaquetas de 1.150.000/mm³ con un intervalo 725.000 a 1.545.000/mm³.

Otros autores consideran que más que la concentración de factores de crecimiento en el PRP, lo importante es la concentración de receptores en las células diana (Marx) (209).

En cualquier caso, debería esclarecerse el efecto biológico de las diferentes concentraciones de los factores de crecimiento evaluados y la cantidad de PRP necesario para conseguir los efectos deseados.

FORMAS DE ACTIVACIÓN DEL PRP

En los países anglosajones la activación del PRP se realizaba mediante trombina bovina+cloruro cálcico (346) (Hartman 1992); sin embargo el posible riesgo de transmisión viral que suponía el uso de este compuesto hizo que algunos autores estudiaran otras formas de activación del PRP.

Landersberg (347) en el año 2000 ofreció un sistema basado en el uso del agente gelificante ITA+cloruro cálcico, y que tenía la ventaja de preparar el PRP sin el uso de trombina bovina ya que el uso de trombina bovina se ha relacionado con el desarrollo de anticuerpos frente a los factores de coagulación V, IX y trombina (348, 349) y el riesgo de desarrollar coagulopatías postoperatorias. La autora, sin embargo, no refiere la composición química del ITA y tampoco refiere el uso clínico de esta forma de activación, de modo que no se saben los posibles riesgos en humanos.

En otro estudio posterior, Landersberg (350) propone el uso del péptido de activación del receptor agonista 6 de la trombina (TRAP) como activador del PRP como variante de la trombina bovina. La autora sugiere que el uso de TRAP puede ser una alternativa segura a la trombina bovina, presenta un excelente tiempo de trabajo y menor retracción del coágulo que los métodos actuales de activación del PRP. Además el grupo de TRAP presenta una liberación más retardada de los factores de crecimiento que el grupo de la trombina, mientras que éste último libera el 84% de los factores de

crecimiento durante las primeras 24 horas, el grupo de TRAP liberó un 39,2% de factores de crecimiento a las 72 horas.

Tsay (351) evalúa la diferente liberación de factores de crecimiento en función del uso de la trombina bovina o el TRAP y la combinación del PRP con sustitutos óseos. Se observa que el uso de sustitutos óseos+PRP provocan una liberación de factores de crecimiento más gradual cuando se activa con TRAP que cuando se utiliza PRP aislado con trombina bovina y también aunque menos, cuando se activa el PRP aislado con TRAP. Sin embargo en el estudio no se compara la cinética de liberación del PRP+sustitutos óseos activado con trombina bovina. De todos modos se desconoce el efecto de la retención de factores de crecimiento en procedimientos de regeneración ósea en función de la activación del PRP con trombina o con TRAP aunque parece depender del modo de activación del PRP así como de la combinación de PRP con sustitutos óseos.

Otra sustancia usada para favorecer la degranulación plaquetaria es el ácido araquidónico (352).

REGENERACIÓN ÓSEA VERTICAL

Existen diferentes modelos animales en los que se ha estudiado la regeneración ósea vertical fundamentalmente mediante la técnica GBR (guided bone regeneration ó regeneración ósea guiada). De acuerdo con este principio se protege un espacio mediante el uso de membranas que actúan a modo de barrera sobre el área donde se pretende conseguir el aumento de tejido óseo; esta barrera persigue estabilizar el coágulo sanguíneo y evitar la penetración de tejido fibroso. Actualmente se utiliza esta técnica junto con la aplicación de diferentes tipos de injertos. El primer ensayo clínico donde se consiguió regeneración ósea vertical mediante la técnica GBR sin el uso combinado de injertos lo refirió Simion en el año 1994 (353) en un estudio sobre 5 pacientes en donde consiguió una regeneración ósea vertical máxima de 4 mm.

Estos resultados fueron confirmados también por Jovanovic en 1995 (354) en un estudio en perros, donde también consiguió un aumento vertical de 4 mm utilizando la misma técnica.

Tinti en 1996 demostró que era posible conseguir una regeneración ósea vertical de 7 mm mediante el uso combinado de chips de hueso y la técnica de GBR (355).

Recientemente, en el 2001, Simion et al (356) realizaron un estudio multicéntrico en donde se evaluaron retrospectivamente 123 implantes colocados consecutivamente en el momento o después de realizar un aumento vertical de la cresta. Se consiguieron aumentos verticales desde 4 mm hasta 8 mm y refirieron un 97,5% de éxito en el uso de esta técnica, considerándola una técnica muy predecible. Los resultados dependían del tipo de injerto que se eligió en cada grupo de estudio.

Sin embargo no existe una opinión común al respecto de la predictibilidad de esta técnica y la regeneración vertical todavía supone un reto para el clínico dedicado a la implantología.

Existen muy pocos estudios de experimentación animal que sugieren un aumento moderado de regeneración vertical de la cresta alveolar mediante el uso de la técnica de GBR (Jovanovic, Jensen) (354,357).

Es esencial para conseguir regeneración vertical que el injerto esté lo suficientemente estable para que los tejidos adyacentes no compriman el injerto e impidan neoformación ósea. La inestabilidad que a menudo presentan los biomateriales sumado a la compresión mecánica de los tejidos adyacentes, hacen que la actividad biológica de estos materiales no se desarrolle. Uno de los problemas más comúnmente asociados en este tratamiento es la dehiscencia y la exposición de la membrana cuando ésta es utilizada para estabilizar el injerto (Schliephake) (358).

Nosotros utilizamos un cilindro de 4 mm de altura que era la altura máxima de hueso regenerado obtenida por Simion en procedimientos de GBR sin la utilización de ningún material de injerto tan sólo el coágulo sanguíneo formado en el interior de la membrana de refuerzo de titanio utilizada, en nuestro caso hemos rellenado la zona que queríamos aumentar con PRP+Bio-Oss. En procedimientos en donde se utiliza injerto en combinación con membrana de refuerzo de titanio se ha llegado a conseguir hasta 7 mm de regeneración vertical.

Estudios previos de Smith en calota de conejo ya demostraron la posibilidad de conseguir regeneración vertical sobre superficies óseas con corticales delgadas como es la calota (359). En nuestro estudio observamos una regeneración ósea vertical de aproximadamente dos tercios del cilindro con el uso de PRP+Bio-Oss, sin embargo parece necesario un periodo de tiempo mayor para conseguir una regeneración ósea completa, a la vista de los resultados histológicos donde la regeneración ósea todavía estaba en proceso después de 4 semanas.

Entre las posibles explicaciones para que la regeneración ósea sea incompleta se encuentran el micromovimiento, la estabilización incompleta del coágulo sanguíneo, el espacio vacío en los cilindros, la invasión de tejido conectivo y periodo de cicatrización insuficiente (360).

En los grupos PRP y control – la ausencia de biomaterial parece que ejerce una influencia negativa en la regeneración ósea, en donde no se consiguió apenas regeneración, a pesar de que el periostio se utilizó como membrana para evitar el colapso de tejido fibroso.

Sin embargo en los grupos Bio-Oss y PRP+Bio-Oss las partículas injertadas, quedaron completamente empapadas de sangre permitiendo la estabilización del coágulo y previniendo la formación de un espacio debajo del periostio. En ambos casos la actividad osteoconductora del Bio-Oss pudo haber favorecido la formación de hueso, situación todavía más evidente en el grupo PRP+Bio-Oss.

Los defectos creados de 10 mm de diámetro evitan la formación de un puente óseo entre los bordes del defecto de forma espontánea como se demuestra en los resultados obtenidos en los grupos PRP y control –.

Los estudios de Pallesen y Aghaloo (317,361) realizan defectos de 6 y 8 mm respectivamente, considerados defectos no-críticos, de modo que deben realizarse estudios donde se evalúe la capacidad regenerativa del PRP en defectos críticos.

La falta de predictibilidad en los procedimientos regenerativos, especialmente en lo que se refiere a regeneración ósea vertical, hacen necesaria la mejora de las propiedades osteoinductivas y osteoconductivas de los materiales de injerto y la búsqueda de nuevas soluciones. Este estudio intenta aportar más datos a la comunidad científica que permitan valorar la idoneidad o no del uso del PRP en procedimientos regenerativos de forma rutinaria.

ELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

La metodología empleada para el estudio histológico de la regeneración ósea vertical conseguida mediante el uso de cilindros de titanio, se ha basado en la técnica sin decalcificar de inclusión en metacrilato descrita por Donath y Breuner (1982) (292) gracias al sistema de corte y pulido Exakt.

Todos los cilindros estudiados tenían estabilidad primaria y fueron encontrados en la misma posición que cuando fueron estabilizados inicialmente al comienzo del estudio.

Respecto a las tinciones utilizadas, empleamos poco la técnica de hematoxilina-eosina, muy usada en otros trabajos, porque el tejido calcificado no la admite, aunque es útil para la identificación de las células óseas. En cualquier caso estamos de acuerdo con algunos autores que afirman que el hueso regenerado puede distinguirse del original por una característica tinción más suave de eosina de aquél (310), de igual forma que las partículas de Bio-Oss se distinguen por una tinción más intensa de eosina.

El tricrómico de Masson tiñe con tonos rojizos el hueso inmaduro y con tonos verdosos el hueso maduro y las partículas de Bio-Oss. Esta tinción tampoco resultó la mejor a la hora de analizar el hueso regenerado, puesto que en ocasiones éste también se teñía con tonos verdosos alrededor de las partículas de Bio-Oss dificultando su diferenciación.

En cambio, el Azul de Toluidina tiñe con tonos azulados el hueso regenerado y con tonos grisáceos las partículas de Bio-Oss, diferenciándose perfectamente.

Las tinciones de Schmörl y Von Kossa, específicas para tejidos calcificados, no se emplearon ya que, tras una prueba inicial no se diferenciaba bien el tejido calcificado del no calcificado, pues se teñían por igual.

EFEECTO DE LOS MATERIALES DE ESTUDIO

GRUPO CONTROL –

En el grupo control se observa la regeneración ósea en forma de una fina lámina que puentea la bóveda craneal de un borde a otro del cilindro en 6 de las 8 muestras, pero no se consigue apenas regeneración vertical a las 4 semanas, ni tampoco se observan indicios de que esta regeneración vertical pueda desarrollarse.

Estos resultados difieren con los obtenidos por Slotte (362) en un estudio de regeneración vertical en calota en ratas con una metodología parecida, en donde encuentra un porcentaje de regeneración ósea de un 36.5% en el grupo control. La única diferencia entre su modelo y el nuestro es que la parte superior del cilindro se cubrió con una membrana, mientras que en el nuestro la parte superior de los cilindros se cubrió con el periostio.

Posiblemente el uso de la membrana en la parte superior del cilindro, en el estudio de Slotte, favoreció una neoformación ósea vertical tan alta, en contraste con el 6,2% de hueso regenerado en nuestro grupo control. Las células del periostio, pesar de su potencialidad osteogénica, no favorecieron, por lo menos en este estudio, la neoformación ósea, aunque es posible que la separación del periostio 4 mm por encima de la superficie externa de la calota craneal limitara su capacidad osteoinductiva.

No obstante, nuestros resultados se parecen a los de Schmid (363), que también obtiene un 6% de regeneración ósea a las 4 semanas en un modelo de GBR parecido al nuestro en el que usó membranas reabsorbibles con forma de cúpula en la calota del conejo para conseguir regeneración ósea vertical.

GRUPO CONTROL + (BIO-OSS)

Los animales de este grupo mostraron un aspecto semejante entre sí tras 4 semanas de cicatrización. Los gránulos de Bio-Oss se encontraban rodeados en su mayor parte de una fina capa de tejido fibroso principalmente a nivel del tercio medio y superior, mientras que en el tercio inferior, que correspondía a la zona en contacto con

la calota craneal del animal, se observó la presencia de trabéculas óseas alrededor de las partículas de Bio-Oss. No se identificaron osteoclastos en la superficie del biomaterial formando lagunas de Howship, ni tampoco células inflamatorias de cuerpo extraño, por lo que podemos deducir que a las 4 semanas, el Bio-Oss en calota de conejo no se ha reabsorbido.

La observación de osteointegración del Bio-Oss evidenciaría la existencia del fenómeno de osteoconducción, por el cual un biomaterial permite el crecimiento óseo en su superficie o a su través. En nuestro estudio la osteointegración del Bio-Oss se observó con frecuencia a nivel del tercio inferior del cilindro, especialmente en las zonas adyacentes a las paredes de titanio del cilindro, y con menos frecuencia en la zona central más alejada de las paredes de titanio, donde las partículas de Bio-Oss se asociaban más con la presencia de tejido fibroso. Esta reacción es similar a la encontrada por Young en defectos óseos maxilares y mandibulares tratados con Bio-Oss. En algunas zonas (no cuantificadas) identifica trabéculas óseas finas en contacto directo con el biomaterial, fenómeno más frecuente en los animales en los que el Bio-Oss había sido mezclado con hueso autólogo (364).

Además la presencia de osteoide nos hace pensar que el proceso osteogénico podría continuar en el tiempo, posiblemente durante otras cuatro semanas según Schmitt (365), que encuentra diferencias en cuanto al hueso regenerado entre la cuarta y la octava semana en procedimientos de regeneración ósea en conejos.

Los resultados obtenidos en este grupo son parecidos a los obtenidos por Slotte (362) en un estudio de regeneración vertical en calota en ratas utilizando cilindros de silicona cubiertos en su parte superior por una membrana. En este estudio Slotte rellenaba unos cilindros con Bio-Oss y otros los dejaba como controles negativos, encontrando un 17,5% de hueso regenerado en el grupo de Bio-Oss frente a un 13,1% de nuestro estudio.

De nuevo Slotte (366) en otro modelo de regeneración ósea vertical en calota en conejos, utilizando cilindros de titanio parecidos a los de nuestro estudio, encuentra un porcentaje de hueso neoformado en el grupo Bio-Oss de un 18,9%, frente a un 16,4% del grupo de hueso autólogo y de un 13% del control. Al igual que en nuestro caso,

también encuentra regeneración a lo largo de la pared interna del cilindro en mayor medida que en el centro del cilindro. También coincidimos con el porcentaje de Bio-Oss remanente cuantificado, 33,5%, frente al 46% de nuestra experiencia.

Otros modelos de regeneración ósea sobre el Bio-Oss muestran resultados diferentes. Hockers (367) cuantifica la osteointegración del biomaterial en un 88% en un modelo de regeneración perimplantaria en el reborde alveolar en perros.

Schmitt (365) implanta Bio-Oss en defectos de tamaño crítico en el radio del conejo, e informa de que el nuevo hueso crece tanto desde los bordes del defecto como en el interior de éste. A las 8 semanas el material está extensamente osteointegrado, aunque el autor no efectúa un estudio cuantitativo de la osteointegración.

En nuestro estudio se observa una osteointegración de un 13% de Bio-Oss y esta osteointegración se observa exclusivamente a nivel del tercio inferior del cilindro.

Sin embargo los modelos de regeneración experimental no son idénticos. El defecto craneal resulta ser un modelo exigente, ya que la cantidad de médula ósea es escasa y la vascularización perióstica, en una zona desprovista de inserciones musculares, resulta bastante limitada.

Nuestro modelo añade un grado de dificultad puesto que no pretende evaluar la regeneración ósea desde los bordes de un defecto bicortical en la calota del conejo, sino que pretende evaluar la regeneración ósea vertical a partir de la base de la calota del conejo en condiciones de osteoporosis. Si a pesar de esta circunstancia observamos un 13% de osteointegración del Bio-Oss y una ganancia en altura de un 46% hacen que los resultados del Bio-Oss sean positivos en este estudio.

Sin embargo también existen estudios que sugieren un efecto de freno y retraso de la mineralización ósea en presencia de Bio-Oss (366) (Slotte), aunque otros autores desmienten este efecto (368) (Klinge).

Así Schmitt (365) sobre defectos en conejos tratados con OsteoGraf/N consigue un porcentaje de hueso neoformado de un 11% a las 4 semanas, mientras que a las 8

semanas sólo consiguió un 16%, a diferencia del grupo control que obtenía un 20% de hueso regenerado en ese tiempo.

Esta posible interferencia ha sido estudiada por Klinge (368), en un modelo de craniectomía en conejo de tamaño no crítico. Este autor observa a las 4 semanas que la mayoría del hueso proviene de los bordes del hueso preexistente. Sin embargo, a las 14 semanas, todo el defecto estaba ocupado por hueso regenerado, y el Bio-Oss había sido casi totalmente reabsorbido, lo que indica que en modelos no críticos este supuesto freno a la regeneración espontánea no se produciría .

Yildirim (369) en un estudio en humanos donde evalúa la técnica de elevación de seno mediante el uso de Bio-Oss+sangre venosa en 15 procedimientos consigue un porcentaje de hueso neoformado de un 14.7%. Histológicamente el hueso neoformado fue evidente en parte invaginando las partículas de apatitas y formando puentes en forma de trabéculas entre las partículas individuales de Bio-Oss. A pesar de la ausencia de actividad osteoclástica, el crecimiento hacia dentro del hueso indica según el autor una lenta reabsorción del injerto xenogénico.

Estos resultados difieren de los datos obtenidos en experimentación animal con el uso de Bio-Oss que consigue porcentajes de hueso neoformado muy superiores. Así Jensen (370) después de 8 semanas observó un 72% de crecimiento óseo alrededor de las partículas de biomaterial en defectos óseos realizados en tibia de conejos y rellenados con Bio-Oss.

Respecto a la reabsorción del Bio-Oss, en nuestro estudio tras 4 semanas de cicatrización, el biomaterial seguía ocupando aparentemente toda el área del cilindro y rodeado de tejido fibroso principalmente en el tercio medio y superior del cilindro. Además no hay signos de reabsorción osteoclástica del Bio-Oss remanente.

Hallazgos similares han sido descritos por Young (364), según la cual, la posible y en todo caso incompleta reabsorción del Bio-Oss se produce por degradación no dependiente de los osteoclastos. Esta suposición se basa en la observación de los contornos del Bio-Oss, que presentan según Young una morfología irregular y en la que no se identifican osteoclastos.

Nosotros no hemos encontrado fragmentos irregulares de Bio-Oss, sino más bien al contrario, observamos partículas con contornos lisos y sin signos de reabsorción. En la mayoría de las tinciones con Tricrómico de Masson y Hematoxilina-Eosina aparece el Bio-Oss fragmentado, mientras que esta circunstancia no se observó en la tinción de Azul de Toluidina, lo que nos hace pensar que esta fragmentación del biomaterial pueda ser atribuida a la técnica histológica, aunque no sabemos muy bien porque se ha producido este fenómeno.

Hockers (367) tampoco encuentra osteoclastos alrededor del biomaterial y señala en su estudio que no es reabsorbido por el organismo.

Por el contrario Klinge (368), en defectos craneales no críticos en cráneo de conejo, señala que el Bio-Oss es casi totalmente reabsorbido a las 14 semanas, a expensas de reabsorción osteoclástica.

Thaller y Therheyden (371,372) también informan de una activa reabsorción osteoclástica del biomaterial.

La unión de osteoclastos a los materiales de injerto depende de la presencia en el injerto de ciertas proteínas con la secuencia de aminoácidos RGD entre otras, que sirvan de enlace con la superficie de los osteoclastos. Estas proteínas pueden ser parte constitutiva del material injertado, o pueden provenir del huésped e incorporarse al material tras su introducción en el organismo.

Taylor (373) ha demostrado una cierta acción osteoclástica *in vitro* frente al Bio-Oss, lo que sería un indicio de la presencia de restos proteicos en su superficie.

Sin embargo nuestros resultados y los de otros autores antes mencionados (367, 369), obtenidos en estudios *in vivo*, indican que tal actividad osteoclástica *in vitro* no se traduce en una acción osteoclástica relevante *in vivo*.

En cualquier caso aunque se llegara a un consenso sobre la incapacidad del organismo de reabsorber el Bio-Oss, esto no sería un impedimento para que fuera considerado un buen biomaterial. Schlegel (374) compara en el modelo de perro Beagle,

el comportamiento del Bio-Oss frente al injerto de chips de hueso autólogo en la técnica de elevación de seno maxilar y colocación inmediata de implantes. El Bio-Oss es netamente superior al hueso autólogo: el hueso autólogo es reabsorbido en casi su totalidad, impidiendo la estabilización secundaria del implante, siendo mucho mayor el BIC (cantidad de hueso en contacto directo con el implante) en el grupo Bio-Oss y la formación de hueso regenerado en los animales de este grupo, que en los tratados con hueso autólogo.

Una contracción mínima se observó del Bio-Oss a diferencia de la referida por Slotte y Schmid (362, 363), que sugieren una contracción del biomaterial de hasta un 21% de la altura de relleno inicial, asociado más a un empaquetamiento más denso del mineral óseo bovino durante la cicatrización que a una actividad reabsortiva.

Aunque en la mayor parte de los estudios no se observan osteoclastos, ni indicios de reabsorción del Bio-Oss, algunos autores han encontrado osteoclastos en biopsias óseas de elevaciones de seno realizadas con Bio-Oss (Zaffe) (375), y defienden la reabsorción del mismo (Pinholt, Klinge) (376,377) sin embargo esta reabsorción debe ser muy lenta ya que diferentes autores encuentran restos de biomaterial a los 30 meses (Duda) (378), a los 44 meses (Skoglund) (379) incluso 6 años después de su uso (Schlegel) (380). Esta circunstancia hace que varios autores consideren al Bio-Oss un material no reabsorbible, a pesar de eso la calidad del hueso regenerado en presencia de Bio-Oss es satisfactoria para la mayoría de los autores.

GRUPO EXPERIMENTAL CON PRP

En este grupo hemos podido constatar el efecto que tiene el PRP sobre los mecanismos regenerativos del hueso, en las fases iniciales de cicatrización en un modelo de regeneración ósea vertical. Se observa una regeneración ósea muy limitada de igual modo que observamos en el grupo control. El aspecto histológico de la regeneración ósea es similar en ambos grupos, en forma de una fina lámina que puentea la bóveda craneal de forma total en casi todos los casos, pero sin conseguir apenas regeneración vertical a las 4 semanas. No se han identificado signos inflamatorios ni de intolerancia al PRP.

Existen diversos estudios que sugieren que el PRP tiene capacidad de aumentar la regeneración ósea tanto en calidad como en cantidad, sin embargo, nosotros no hemos podido constatar la existencia de hueso neoformado con la utilización del PRP de forma aislada en nuestro modelo experimental (209,210).

Conviene señalar algunos de los anteriores estudios combinaban PRP con hueso autógeno, mientras que nosotros no hemos combinado el PRP con ningún tipo de injerto. Tampoco se evaluaron en estos estudios la capacidad del PRP aislado en procedimientos de regeneración ósea vertical.

Zechner (381) sugiere una acción del PRP dependiente del tiempo, favoreciendo la actividad de hueso regenerado en las fases tempranas de cicatrización alrededor de la 3ª y 6ª semanas, a partir de este momento el efecto del PRP parece ir decreciendo hasta no encontrarse diferencias de hueso nuevo regenerado a las 12 semanas.

Estos estudios entran en contradicción con los de Aghaloo y cols, (382) que mediante evaluación radiográfica encuentra una menor densidad ósea en grupos tratados con PRP frente a controles en tiempo distintos 1, 2 y 4 meses, aunque no presenta diferencias estadísticamente significativas. También en su evaluación histomorfométrica sugiere una tendencia hacia una menor regeneración ósea respecto al control a 1, 2 y 4 meses sin que fuera estadísticamente significativa. Realiza defectos bicorticales de 8 mm de diámetro no-críticos en calota en conejos.

Nosotros al igual que Aghaloo tampoco encontramos diferencias entre el grupo control y el grupo PRP.

Fuerst y cols (383) afirman por el contrario que la aplicación del PRP en la colocación de implantes es suficiente para incrementar el BIC en hueso cortical de minipigs.

Resultados similares obtienen Fontana y cols (384) en un estudio en ratas en donde a los 30 días se encuentra una cantidad de hueso nuevo neoformado significativamente superior alrededor de los implantes en el grupo tratado con PRP con

respecto a controles. En este sentido todo parece indicar que la acción del PRP podría disminuir los tiempos de regeneración.

Schlegel y cols, (385) por el contrario no consideran el uso del PRP aislado como un factor que favorezca la cicatrización ósea en las primeras fases y no encuentra diferencias entre el uso del PRP con respecto a controles a diferencia del colágeno (Collos[®]) que sí favorece la regeneración ósea en fases tempranas entre la 2^a y 4^a semana de cicatrización ósea.

Del mismo modo Yamada y cols, (386) sostienen el beneficio del PRP asociado a células mesenquimales, pero no su uso de forma aislada, que presentaba resultados similares a los controles.

Otro de los factores presumiblemente importantes en el uso del PRP parece ser su concentración, de manera que Weibrich (328) incluso llega a sugerir que mientras concentraciones por debajo de 1,000,000/ μ l presentan un efecto subóptimo, concentraciones superiores a esa concentración podrían tener paradójicamente efectos inhibitorios. A pesar de estas afirmaciones su experiencia en el uso de PRP aislado a 1,000,000/ μ l no evidencia beneficios significativos en la regeneración ósea asociada a la colocación de implantes.

Además de estos trabajos existen varios autores que reflejan los beneficios del uso del PRP en casos aislados sin controles, basados en observaciones subjetivas que no pueden tomarse en consideración debido al escaso rigor científico de los mismos (387, 388, 389).

Sin embargo el uso del PRP generalmente asociado a biomateriales y hueso autógeno, ha sido defendido en numerosos artículos, situación con la que estamos de acuerdo a la vista de nuestros resultados.

GRUPO EXPERIMENTAL PRP + BIO-OSS

El objetivo de asociar PRP+Bio-Oss fue evaluar la capacidad del PRP para potenciar las propiedades osteoconductoras del Bio-Oss.

El uso de Bio-Oss como vehículo de proteínas morfogenéticas ha sido estudiada por Therheyden (372), utilizando un modelo de implantes dentales en elevación de seno maxilar. Se demostró que la adición de OP-1 (BMP-7) al Bio-Oss aumentaba la osteointegración de los implantes y mejoraba las cualidades osteoconductoras del Bio-Oss.

En nuestro estudio la adición de PRP a los gránulos de Bio-Oss ha producido el mayor porcentaje de regeneración ósea de todos los grupos estudiados con un 21,3% de hueso regenerado frente a un 13,1% del grupo Bio-Oss y un 6,2% y un 5,6% de los grupos PRP y control respectivamente.

Este efecto combinado puede ser explicado por dos mecanismos complementarios: la capacidad osteoconductoras del Bio-Oss y la potencialidad mitogénica, diferenciadora y quimiotáctica que se le atribuye al PRP.

Obarrio (390) no sólo considera el efecto positivo del PRP debido a la liberación de factores de crecimiento sino también a sus propiedades físicas y químicas. El alto contenido en fibrina hace que el PRP actúe como agente hemostático y estabilizador favoreciendo la inmovilización tanto del coágulo sanguíneo como del injerto óseo en el área a regenerar. La estabilización del coágulo sanguíneo es una de las circunstancias que más importancia tienen en las primeras fases de los procedimientos de regeneración ósea. Por lo tanto son diferentes los factores por los cuales el PRP actúa sobre procedimientos regenerativos. También el propio efecto osteoconductor de la fibrina que complementaría el del Bio-Oss.

Los estudios de Marx y Anitua (209,210) sugieren que el uso del PRP+hueso autógeno tiene capacidad sobre el aumento de la regeneración ósea tanto en calidad como en cantidad.

Así Marx (209), evidencia una aceleración y aumento en la densidad del hueso neoformado a los 6 meses respecto del grupo control, valorado mediante radiografías panorámicas. Llega incluso a sugerir una maduración dos veces mayor que en los controles. Adicionalmente en la histomorfometría observó una mayor densidad ósea en el grupo tratado con PRP.

Sin embargo Shamanan, en el 2001 (391), utilizando técnicas de ROG mediante la utilización de PRP + hueso autólogo no considera que asociar PRP al hueso autólogo mejore la regeneración en sentido vertical y horizontal ni aumente la calidad del tejido neoformado.

Oyama y cols (392) sugieren que la aplicación de PRP incrementa la capacidad osteogénica del hueso autógeno y disminuye la reabsorción ósea del injerto. Sin embargo Schmitz y Hollinger (393) dudan de los efectos del PRP debido al efecto inhibitorio del PDGF sobre células osteoblásticas cuando se libera continuamente. Este estudio demuestra por el contrario la capacidad del PRP de incrementar la osteogénesis en mayor medida que la reabsorción ósea en un periodo de remodelado de 6 meses.

Jakse y cols (394) muestran también una capacidad regenerativa del PRP de muy bajo potencial, en un trabajo que evalúa el uso de PRP+hueso autógeno frente a hueso autógeno en elevaciones de seno en 12 ovejas a las 4 y 12 semanas. Se evaluó mediante histomorfometría el porcentaje de hueso neoformado y el porcentaje de area de contacto entre el hueso injertado y el hueso regenerado. A las 4 semanas el porcentaje de hueso neoformado en el grupo PRP fue de 29.2% mientras que en el control fue 26.1% y a las 12 semanas 46.9% en el control y 51.1% en el PRP. El área de contacto entre el injerto y el hueso regenerado fue a las 4 semanas de 73% en el control y 78.5 en el PRP y a las 12 semanas 87.7% en el control y 90.1% en el lado de PRP.

Fennis (395) estudia la reconstrucción mandibular en 28 cabras en las que en 14 de ellas se utilizó PRP+ hueso autógeno para acelerar la cicatrización ósea. El uso del PRP parece acelerar la regeneración ósea considerablemente entre la 6^a la 12^a semana pero no en la 3^a semana valorado en radiografías panorámicas. El análisis histomorfométrico sugiere que el grupo no tratado con PRP presenta mayor encapsulación de tejido fibroso que se hace más significativo a las 6^a y 12^a semanas; además el grupo de PRP presentó mayor porcentaje de hueso regenerado y mayor densidad de capilares que el control. Los resultados sugieren efectos positivos en la utilización de PRP junto con injertos autógenos, aumentando la vascularización y el crecimiento de hueso neoformado. A pesar de que al PRP se le atribuyen efectos positivos en las primeras fases de la cicatrización ósea, en este estudio las diferencias se

hacen más evidentes después de la sexta semana, contradiciendo el hecho de que los factores de crecimiento liberados por las plaquetas actúan los primeros días después de su aplicación.

Por el contrario Choi (396) evalúa el efecto del PRP en la regeneración ósea en reconstrucciones mandibulares en 8 perros en modelo de boca partida. En el lado control se utilizó hueso autógeno, mientras en el experimental PRP+hueso autógeno. Se tomaron biopsias a las 6 semanas mostrando un menor porcentaje de hueso regenerado en el grupo PRP respecto del control. El grupo sin PRP presentó un porcentaje de hueso regenerado de un 56.7%, respecto del 36.8% del grupo con PRP. En microscopía de fluorescencia se demostró un retraso en el remodelado de los injertos con PRP. Estos hallazgos sugieren que la adición de PRP no parece incrementar la formación ósea en injertos de hueso autógeno. La media de concentración de plaquetas en el PRP fue de 1.120.000.

Diversos estudios han sugerido que variaciones en la concentración de PDGF tiene influencia en la regeneración ósea. Marden (397) refirió que el PRP a determinadas concentraciones puede inhibir la regeneración ósea. Sin embargo la concentración utilizada en el estudio de Choi entra dentro del rango que Weibrich (328) considera beneficioso.

Kim y cols (398) evalúan el uso de dentina particulada-yeso de Paris (sulfato cálcico) tanto de forma aislada como en combinación con PRP frente a controles en defectos alrededor de implantes en perros. Los resultados sugieren que tanto el uso de la dentina particulada aislada o en combinación con PRP consiguen rellenar de hueso neoformado los defectos oseos alrededor de implantes, mientras que el grupo control presenta regeneración ósea sólo en la parte inferior de los implantes. Los resultados histomorfométricos revelaron un mayor porcentaje de hueso regenerado en los grupos experimentales frente a control a las 6 semanas ($p < 0.05$). Los dos grupos experimentales entre sí también presentaron diferencias estadísticamente significativas, obteniendo mayor porcentaje de hueso regenerado en el grupo de PRP. A las 12 semanas los porcentajes de hueso regenerado en los dos grupos experimentales ya no presentaban diferencias significativas entre ellos aunque sí con respecto al control. Los mismos resultados se obtuvieron para el BIC.

Nuestros resultados coinciden con los de Kim en un mayor porcentaje de regeneración ósea en el grupo de PRP asociado a biomaterial.

En otro estudio Kim et al (399), evalúan el uso de DFB+PRP frente a DFB y control en defectos óseos alrededor de implantes. Los resultados que se presentan sugieren que el uso tanto de PRP+DFB como de DFB aislado consiguieron rellenar la superficie del defecto con hueso neoformado, mientras que el control no presentó apenas regeneración ósea. Aún así el uso de PRP+DFB mejora el BIC con respecto al DFB con significación estadística a las 12 semanas, a diferencia del anterior trabajo en el que no encontró diferencias significativas a las 12 semanas.

La disminución en los tiempos para inserción y carga del implante, ha sido referida por Kassolis y cols (331), en casos de utilización de PRP+FDDBA en procedimientos de elevación de seno.

Por otro lado, Sánchez (360) no encuentra efectos beneficiosos en el uso del PRP, de acuerdo con un estudio en el que la evaluación densitométrica sugería que la combinación de PRP con DFBA para la regeneración de defectos óseos alrededor de implantes en perros, no presentaba diferencias estadísticamente significativas respecto del uso aislado de DFBA. En nuestro estudio la evaluación densitométrica tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos PRP y PRP+Bio-Oss, sin embargo, sí que encontramos diferencias histomorfométricas. Sería preciso un análisis histomorfométrico en el estudio de Sánchez que pudiera confirmar sus resultados densitométricos.

Demiralp (400) evalúa la utilización de PRP+TCP en el tratamiento de la lesión inflamatoria periapical. Los resultados radiográficos sugieren una reabsorción de las partículas de TCP y sustitución por hueso nuevo regenerado a los 12 meses de la cirugía. Se sugiere una reabsorción más rápida del biomaterial y una estimulación para la formación de nuevo hueso. Sin embargo no presenta controles ni estudio histológico.

Basa (333) evalúa la utilización de PRP+TCP en la realización de la técnica split de cresta en regiones posteriores edentulas estrechas. Sugiere que además de incluir las ventajas del PRP en la regeneración ósea, el preparado se comporta de forma que

rellena todos las interfases entre los gránulos de TCP impidiendo la invasión fibroblástica del injerto. El tiempo de consolidación ósea utilizando diferentes sustitutos óseos oscila entre 6 y 9 meses, el uso del PRP puede reducir los tiempos entre 3 y 6 meses.

Suba (401) cuantifica el efecto del PRP+TCP frente a TCP aislado en la regeneración de alveolos postextracción en 12 perros a las 6, 12 y 24 semanas tras la cirugía. Los resultados histomorfométricos a las 6 semanas fueron en el grupo PRP+TCP un 45.9% de neoformación ósea y en el TCP un 30.8% con significación estadística. Sin embargo a las 12 semanas, aunque el grupo de PRP todavía presentaba mayor regeneración fue mucho menos marcada que a las 6 semanas (un 52.5% frente a un 49.4% respectivamente) y a las 24 semanas la diferencia había desaparecido para igualarse 61.9% frente a 62.9. El autor sugiere que la adición del PRP+TCP puede ser ventajosa consiguiendo una rápida e intensa neoformación ósea en las primeras fases de la cicatrización

Wiltfang en 2003 (402) atribuye al PRP una mínima capacidad de aceleración de la regeneración ósea cuando se combina con fosfato tricálcico (TCP) y un discreto aumento en la formación de nuevo hueso, cuantificando entre 8-10% más de hueso cuando se aplicó PRP aislado. No se observó degradación más rápida del sustituto óseo cerámico y sin embargo sí se observaron células gigantes de cuerpo extraño rodeando a los gránulos de TCP cuando se añadió PRP, posiblemente debido al efecto quimiotáctico que el TGF tiene sobre los fibroblastos. Posteriormente el mismo autor en un estudio animal sugiere que el PRP no añade ningún beneficio cuando se combina con fosfato tricálcico (TCP) (403).

Esta circunstancia sin embargo no la hemos observado en el uso combinado de PRP con Bio-Oss, ni tampoco la existencia de células gigantes de cuerpo extraño rodeando las partículas de Bio-Oss, que en su mayoría estaban rodeadas de trabéculas óseas principalmente en el tercio inferior y medio del cilindro. Sin embargo, estamos de acuerdo que el uso del PRP no parece influir en la reabsorción del biomaterial.

Froum (404) sin embargo, en un estudio histomorfométrico sobre la eficacia del PRP en la técnica de elevación de seno utilizando hidroxiapatita bovina+PRP, no

encuentra diferencias significativas en el porcentaje de hueso neoformado respecto al uso aislado de hidroxiapatita bovina, al contrario que en nuestro estudio.

Rodriguez y cols en 2003 (405), defienden la efectividad de la aplicación del PRP+Bio-Oss encontrando en las zonas de hueso injertado una densidad ósea similar al hueso nativo en tomografía computarizada (TC) y una rápida consolidación del hueso injertado. Llegan incluso a proponer la hipótesis de que esta combinación posee propiedades osteoinductivas. La disminución de los tiempos de cicatrización es lo verdaderamente interesante según sus autores puesto que para la segunda fase esperó 4 meses en lugar de los 6-9 recomendados en procedimientos de elevación de seno con poca estabilidad primaria del implante. Sin embargo la ausencia de controles impide una valoración objetiva del estudio.

Aghaloo y cols (382) evalúan la regeneración ósea en defectos de 8 mm de diámetro en la calota craneal de 15 conejas mediante la utilización de diversos materiales: Bio-Oss, hueso autógeno y Bio-Oss+PRP a 1 mes, 2 meses y 4 meses. Radiográficamente todos los grupos tratados presentaron un incremento significativo de la densidad ósea con respecto a los controles. No se obtuvieron diferencias significativas en la densidad ósea evaluada radiográficamente entre los grupos experimentales. Sin embargo estos resultados discrepan de los obtenidos por Kim (399) que mostraron diferencias significativas en la densidad ósea al mes y 2 meses evaluados radiográficamente, cuando se añadía PRP al Bio-Oss en defectos en calota craneal. El estudio histomorfométrico demostró un incremento de hueso estadísticamente significativo del injerto autógeno respecto de las áreas de Bio-Oss, PRP+Bio-Oss y control. El PRP+Bio-Oss presentó también diferencias significativas en el incremento óseo respecto del Bio-Oss aislado; este dato está en desacuerdo con Froum (404), donde tras la evaluación histológica del PRP+Bio-Oss y Bio-Oss aislado en elevaciones de seno en humanos no encontró mejores resultados con el uso de PRP.

Fuerst (406) evalúa el efecto en la regeneración ósea de un sellante de fibrina (FS) con PRP, FS aislado y controles en defectos mandibulares corticales en 8 minipigs a las 4 y 8 semanas. Con respecto a la formación de hueso nuevo no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tres grupos a las 4 y 8 semanas y se sugiere la ausencia de beneficios en la adición de PRP en la regeneración ósea. El porcentaje de

hueso neoformado a los 4 semanas en el grupo control fue 14.19%, en FS aislado 16.9% y FS+PRP 21.4%. A las 8 semanas FS 45.5%, FS+PRP 51.4% y 54.0% en los controles. Sólo se observó un ligero incremento en la formación de hueso neoformado cuando se añadió PRP+FS a las 4 semanas. En nuestro caso observamos que a las 4 semanas sí se encuentran diferencias significativas, a diferencia de Fuerst.

Yamada (386) sostiene el beneficio del PRP asociado a células mesenquimales, que mejora la regeneración ósea a las 8 semanas, pero no su uso de forma aislada, que presentaba resultados similares a los controles y no mejoró la regeneración ósea.

Roldan (407) sugiere que el PRP no mejora la osteointegración de implantes dentales en procedimientos de elevación de seno en un período de estudio de 6 semanas.

El mismo autor en otro estudio en ratas no observó diferencias entre el grupo experimental en el que se utilizó PRP+Bio-Oss y el grupo control (Bio-Oss sólo), a pesar que el estudio bajo luz fluorescente sugiere una aceleración en la aposición de hueso en el grupo PRP respecto del control. Llega a la conclusión de que el PRP no mejora la neoformación ósea cuando se combina Bio-Oss (408).

De nuevo Fuerst (409) evalúa el uso de PRP, PRP+colágeno tipo I y controles en la regeneración de defectos óseos mandibulares en minipigs a las 4 y 8 semanas. A las 4 semanas el porcentaje de hueso neoformado en el PRP+Colágeno fue de un 17.6%, el colágeno 29.8% y el control un 13.4%, encontrando diferencias significativas sólo entre el grupo colágeno y control, sin embargo el porcentaje de hueso neoformado en el grupo colágeno fue superior al de PRP+colágeno de modo que el PRP en este caso no tuvo influencia en las primeras fases de la regeneración ósea cuando se combina con colágeno. El grupo control presenta porcentajes de regeneración parecidos al PRP+colágeno, pudiendo valorar en este dato un efecto negativo del PRP sobre el colágeno. A las 8 semanas la neoformación obtenida en el grupo PRP+colágeno fue de 53.3%, en el grupo colágeno un 62.8% y en el control un 54.2%. Aunque no se observan diferencias significativas intergrupos, todavía el grupo colágeno presentó mayor neoformación ósea que el resto, que presentan el mismo porcentaje de regeneración ósea. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que la aplicación de

colágeno puede ser beneficiosa durante las primeras fases de la neoformación ósea y que no se beneficia de la adición de PRP.

Aunque una mayoría piensa que es positivo, todos estos resultados contribuyen a generar una opinión confusa acerca de los beneficios del PRP en la regeneración ósea (tablas XX y XI) y hace que sean necesarios muchos más estudios que clarifiquen el papel del PRP en los procedimientos regenerativos.

EXPERIMENTACIÓN ANIMAL MEDIANTE APLICACIÓN DE PRP						
	PRP Aislado	PRP+Bio-oss	PRP+h.autógeno	PRP+DFBA	PRP+Cerasorb	PRP+Otros
Fennis (2001)			✓			
Kim (2002)				✓		
Kim (2002)						X
Aghaloo (2002)	X		X			
Choi (2003)			X			
Fuerst (2003)	✓	X				
Zechner (2003)	X					
Schlegel (2003)	X					
Jakse (2003)			X			
Aghaloo (2004)		✓	✓			
Fuerst (2004)						X
Fennis (2004)				✓		
Yamada (2004)	X					
Roldan (2004)		X				
Schlegel (2004)			X			X
Weibrich (2004)	X					
Fontana (2004)	✓					
Wiltfang (2004)		X	✓		X	

Suba (2004)					X	
Fuerst (2004)						X
Velich (2004)					✓	
Jensen (2005)				X		
Butterfield (2005)			X			
Sweenen (2005)	✓					
Sanchez (2005)				X		

Tabla XX. Resultados de diferentes estudios existentes con el uso de PRP en experimentación animal. Aparacen marcados con una **X** aquellos estudios donde no se observaron efectos beneficiosos con el uso del PRP y con una **✓** aquellos estudios donde se observaron efectos beneficiosos con el uso del PRP.

APLICACIÓN DE PRP EN HUMANOS						
	PRP Aislado	PRP+Bio-oss	PRP+h.autógeno	PRP+DFBA	PRP+Cerasorb	PRP+Otros
Marx (1998)			✓			
Anitua (1999)	✓		✓			
Kassolis (2000)				✓		
Shamanan (2001)	X					
Robioni (2002)	✓					
Froum (2002)		X				
Camargo (2002)		✓				
Wiltfang (2003)					X ✓	
Rodríguez (2003)		✓				
Lekovic (2003)		✓				
Philippart (2003)			✓			
Wojtowicz (2003)		✓				
Oyama (2004)			✓			
Ziv Mazor (2004)		✓	✓			
Kitoh (2004)						
Demiralp (2004)					✓	
Basa (2004)					✓	
Roldán (2004)	X					
Mercks (2004)			✓			

Tabla XXI. Resultados de diferentes estudios existentes con el uso de PRP en humanos.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Aunque la densidad de masa ósea (DMO) es superior en el grupo experimental PRP+Bio-Oss frente al control – y al grupo PRP, no existen diferencias significativas respecto al control +, en el que se utilizó Bio-Oss como material de relleno, de forma que el uso del PRP no influyó en la densidad mineral ósea.

- 2) El uso de PRP no aceleró la reabsorción del biomaterial, observando porcentajes parecidos de biomaterial remanente tanto en el grupo experimental PRP+Bio-Oss como en el control +, en el que se utilizó Bio-Oss aislado.

- 3) La utilización de PRP asociado a un biomaterial osteoconductor mejora, de forma estadísticamente significativa la regeneración ósea vertical con respecto al uso aislado del biomaterial, del PRP y del control –, confirmando de esta forma la hipótesis de trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Zarb GA, Smith A. The longitudinal clinical effectiveness of osteointegrated dental implants: the Toronto study. Part I. Surgical results. *J Prosthet Dent* 1990; 63:451-7.
2. Zarb GA, Smith A. The longitudinal clinical effectiveness of osteointegrated dental implants: the Toronto study. Part II. The prosthetic results. *J Prosthet Dent* 1990;64:53-61.
3. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol* 2002;29:197-212.
4. Weber HP, Crohin CC, Fiorellini JP. A 5-year prospective clinical and radiographic study of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:144-53.
5. Consensus Development Conference. Diagnosis, Prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993;94,646-50.
6. Rico Lenza H, Pérez Infante V. Edad sexo y hueso II. *Rev Esp Gerontol* 1979;14,409-16.
7. Nishimura I, Hosokawa R, Atwood DA. The knife-edge tendency in mandibular ridges in women. *J Prosthet Dent* 1992;67(6):820-6.
8. Dao TT, Anderson JD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants? *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8:137-42.
9. Friberg B. Treatment with dental implants in patients with severe osteoporosis: A case report. *Int J Periodont Res Dent* 1994; 14:349-55.
10. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo N. Osseointegration of dental implants in rabbit with low mineral density. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 55,351-61.
11. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Impl Res* 2002;13,623-30.
12. Nevins M. Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Periodont Rest Dent* 1996; 16: 9-19.
13. Alpaslan C, Irie K, Takahashi K, et al. Long term evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone formation with a biologic and synthetic delivery system. *Br J Maxillofac Surg* 1996; 34: 414-8.
14. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3 years results of a pilot study in humans. *J Periodontol* 2000; 71: 1241-57.
15. Marx R, Meltzer A. Donde no hay hueso, no hay implantes. *Rev Esp Odontoestomológica de Implantes* 2000; 8 (1): 32-3.
16. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo -Dias LL. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52(2):161-6.
17. Arbes H, Bösch P, Salzer M. First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting, combined with the fibrine adhesive system (F.A.S). *Arch Orthop Trauma Surg* 1981;98:183-8.
18. Antonaides HN. Human platelet -derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc Nat Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7314-7.
19. Antonaides HN, Owen AJ. Growth factors and regulation of cell growth. *Ann Rev Am Cell* 1982; 33: 445-63.
20. Slater M, Patava J, Kinghan K, Mason S. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995; 13:655-63
21. Whitman DH, Berry R, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-9.
22. Marx R, Carlson E, et al. Platelet-rich plasma. Growth factors enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 85: 638-46.
23. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:429-535.
24. Antonaides HN, Hunkapiller MW. Human platelet-derived growth factor (PDGF): Aminoterminal aminoacid sequence. *Science* 1983;220:963-5.
25. Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams R, et al. The effect of short-term application of a combination platelet derived growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991;62:458-67.
26. Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional Histology*. New York: Churchill Livingstone Ed. ; 1987.p.142-60.

27. Vaughan J. Osteogenesis and haematopoiesis. *Lancet* 1981; 2,133-5.
28. Tresguerres IF. Influencia de la Hormona de Crecimiento en la Osteointegración. Tesis Doctoral 1999. U.C.M.
29. Price PA. Bone Gla Protein (BGP, osteocalcin) a biochemical marker for bone turnover. *Calcif Tissue Int.* 1984; 36 (suppl), S 86.
30. Jilka RL: Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency: A 1998 update. *Bone* 1998;23 (2):75-81.
31. Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop* 1985; 200:87-9.
32. Lanyon L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 1995; 53: S102-7.
33. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. Academic Press Inc, San Diego,1996.
34. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodont Res* 1991;26:213-7.
35. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
36. Raisz LG. Osteoporosis. *J Am Geriat Soc.* 1982; 30, 127-138.
37. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y et al. Interleukin 6: a potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 1992;89:46-52.
38. Raisz, G. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Eng J Med* 1988; 318; 818-28.
39. Eastel R, Blumsonh A. The value of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J Rheumatol* 1997; 24: 1215-7.
40. Hurley MM, Lee SK, Raisz LG et al. Basic Fibroblast Growth Factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures. *Bone* 1998;22(4):309-16.
41. Reddi A. Extracelular matrix and development. In: Piez KA, Reddi AH (eds). *Extracellular Matrix Biochemistry*. New York: Elsevier,1984.p.375.
42. Raghov R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J* 1994;8:823
43. Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int* 2003;72:2-4.
44. Risteli, L. Marcadores óseos procedentes del colágeno tipo I: PICP, ICTP y PINP. *REEMO* 1996; 5, 81-5.
45. Gehron Robey P, Fedarko NS, Hefferan TE et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 1993; 8 (suppl 2): S483-7.
46. Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. *Horm Res* 1997; 48 (suppl 5): 50-9.
47. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA et al. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995; 95:881-7.
48. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989;18,4:903-18.
49. Dziewaitkowski DD, Majznerski LL. Role of proteoglycans in endochondral ossification. *Calcif Tissue Int* 1985;37:560-5.
50. Blumenthal NC. Mechanisms of inhibition of calcificaion. *Clin Orthop* 1989;13:279-89.
51. Roberts E. Bone Tissue Interface. *J Dental Educat* 1988;52:804-9.
52. Parfitt AM, Villanueva AR, Foldes J, Rao DS. Relations between histologic indices of bone formation. Implication for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995; 10:466-73.
53. Compston IE. Sex steroids and bone. *Phisiol Rev* 2001;81:419-47.
54. Tanaka Y, Morimoto Y, Nakano Y et al. Osteoblasts are regulated by cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J Bone Miner Res.* 1995; 10: 797-801.
55. Rico Lenza H, Díaz Mediavilla J. Las células ósea sus orígenes e implicaciones. *Rev Clin Esp* 1982; 166: 257-61.
56. Mundy GR. Factors which stimulate bone growth in vivo. *Growth Regulation* 1993;3:124-28.
57. Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop* 1995; 313:19-26.
58. Raisz G. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Eng J Med* 1988;318: 818-8.
59. Tanaka Y, Morimoto Y, Nakano Y et al. Osteoblasts are regulated by cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J Bone Miner Res.* 1995; 10: 797-801.
60. Wright NM, Renault J, Willi S, et al. Greater secretion of growth hormone in black than in white men: possible factor in greater bone mineral density. A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 2291-97.

61. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, et al. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest* 1987; 80: 706-10.
62. Peacock M, Liu G et al. Bone mass and structure at the hip in men and women over the age of 60 years. *Osteoporos Int* 1998;8:231-39.
63. Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 1978;201:1138-41
64. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77:940-56.
65. Raisz G. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Eng J Med* 1988; 318: 818-28.
66. Raisz G. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res* 1993; 8 (suppl 2): 457-65.
67. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodont Res* 1991; 26: 213-7.
68. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18 (4): 903-18.
69. Chow J, Tobias TH et al. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest* 1992;89:74-8
70. Kassem M, Blum W, Ristelli J, et al. GH stimulates the proliferation and differentiation of normal osteoblast like cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 222-226.
71. Tatakis D. Interleukin-1 and Bone Metabolism: A Review. *J Periodontol* 1993; 64: 416-31.
72. Jilka RL, Hancog G, Giarasole G, et al. Increased osteoclasts development after estrogen loss: Mediation by Interleukin-6. *Science* 1992; 257: 88-91.
73. Giarasole G, Passeri G, Jilka RL, et al. Interleukin 11: A new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest* 1994; 93:1516-24.
74. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, et al. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995; 313: 36-46.
75. Eastel R, Blumsonh A. The value of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *J Rheumatol* 1997;24:1215-17.
76. Ponce A, Peris P, Álvarez L, Muñoz-Gómez J. Significado de un aumento de fosfatasa alcalina. *Rev ClinEsp* 1997; 197: 56-9.
77. Van Daele PLA, Birkenhanger JC. Biochemical markers of bone turnover: an update. *Neth J Med* 1994; 44: 65-72.
78. Delmas P, Malaval L, Arlot ME. Serum bone-gla protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone* 1985; 6: 339-44.
79. Deftos L.J, Wolfert RL, Hill CS. Bone alkaline phosphatase in Paget's disease. *Horm Metab Res* 1991;23:559-61.
80. Vergnaud P, Garnero P, Delmas PD. Undecarboxylated osteoclcin measured witha specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women. The EPIDOS study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 719-24.
81. Risteli L. Marcadores óseos procedentes del colágeno tipo I: PICP, ICTP y PINP. *REEMO* 1996; 5: 81-5.
82. Peris P, Álvarez L, Durán M. Effect of surgical menopause and hormone replacement therapy on the new biochemical markers of bone turnover. *Osteoporosis Int* 1996; 6(suppl 1): S 204-9.
83. Price CP, Kirwan A, Vader C. Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. *Clin Chem* 1995; 41: 643-5.
84. Cheung P, Panesar NS, Masarei J, Swaminathan R. Immunoassay of a tartrate-resistant acid phosphatase in serum. *Clin Chem* 1995; 41: 679-86.
85. Guerrero R, Díaz Martin MA, Díaz Diego EM., De la Piedra, C. New biochemical markers of bone resorption derived from collagen breakdown in the study of menopausal osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1996;45:234-8.
86. Delmas P, Schlemmer E, Gyneys E, Riis BJ, Christiansen C. Urinary excretion of pyridoline cross-links correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients, with vertebral osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 6: 639-44.
87. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine Reviews* 1996; 17: 333-68.
88. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner* 1993; 8: 127-32.

89. Hassager C, Jessen LT, Podenhant J, Thomsen K, Christensen C. The carboxyterminal pyridoline cross-linked telopeptide of type I collagen in serum as a marker of bone resorption: the effect of nandrolone decanoate and hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 30-3.
90. Garnero P, Gineyts E, Riou JP, Delmas P. Assesment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 780-5.
91. Hanson D.A, Weis MAE, Bollen AM, Maslan SL, Eyre DR. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: Quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1252-8.
92. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 1990; 112: 352-64.
93. Levy JR, Murray E, Manolagas S et al. Demostration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 1986; 119: 1786-92.
94. Baran BT, Braverman LE. Thyroid hormones and bone mass. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:1182-3.
95. Schaaf OP, Biering-Sorensen F, Bohr HH. Longitudinal study of bone mineral content in the lumbar spine, the forearm and the lower extremities after spinal cord injury. *Calcif Tissue Int* 1991; 48(suppl) :76-9.
96. Diamond T, Stiel D, Lunzer M et al. Osteoporosis and skeletal fractures in chronic liver disease. *Gut* 1990; 31: 82-7.
97. Consensus Conference Copenhagen 1990. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1991; 1:114-7.
98. Jose Manuel Quesada Gómez. 25-Hidroxivitamina D y Osteoporosis. 1998 Laboratorios FAES
99. Rico Lenza, H., Pérez Infante, V., y cols. Edad, sexo y hueso II. *Rev Esp Gerontol* 1979; 14: 409-16.
100. Toodgood AA, O'Neill PA, Shalet SM. Beyond the somatopause: GH deficiency in adults over the age of 60 years. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:460-5.
101. Chow J, Lean JM, Chambers TJ. 17 β -estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology* 1992; 130: 3025-32.
102. Chow J, Tobias JH, Colston KW. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest* 1992; 89: 74-8.
103. Sada Moreno, Emiliano. Análisis de mil implantes "Klockner". *Odontoestomatológica de Implantes* 1995; 3: 71-3.
104. Steven, E., & Wollan, P.C. *J Prosthet Dent* 1998; 79(4): 415-21.
105. Pina Ramón F, Figarola M, Contera M et al. Resultados del Servicio del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, en el año 1995 con implantes "Klockner". *Rev Esp Odontoestomatología de Implantes* 1996;4:205-10.
106. Chanavaz M. Sinus grafting related to implantology. Statistical analysis of years of surgical experience (79-94). *J Oral Implantol* 1996;22:119-30.
107. Nishimura I, Hosokawa R, Atwood DA. The knife-edge tendency in mandibular residual ridges in women. *J Prosthet Dent* 1992; 67 (6): 820-6.
108. Kribbs PJ, Chesnut CH, Smith DE. Oral findings in osteoporosis. Part II: relationship between residual ridge and alveolar bone resorption and generalize skeletal osteopenia. *J Prosthet Dent* 1983; 50(5): 719-24.
109. Mohajery M, Brooks S. Oral radiographs in the detection of early signs of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73: 112-7.
110. Miller SC, Bowman BM, Miller MA, Bagi CM. Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. *Bone* 1991;12:439-46.
111. Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. *Calcific Tissue* 1995; 56: 305-10.
112. Klemetti E, Vainio P, Lassila V, Alhava E. Trabecular bone mineral density of mandible and alveolar height in postmenopausal women. *Scand J Dent Res* 1993; 101:166-70.
113. Atkinson PJ, Woodhead C. Changes in human mandibular structure with age. *Arh Oral Biol* 1968;14:1453-63.
114. Von Wowern N, Stoltze K. Changes in bone mass in rat mandibles after tooth extraction. *J Oral Surg* 1979; 8: 229-33.

115. Rosenquest JB, Baylink DJ, Berger JS. Alveolar atrophy and decreased skeletal mass of the radius. *Int J Oral Surg* 1978; 7: 479-81.
116. Kribbs PJ, Chesnut CH, Kilicoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent* 1989;62:703-7.
117. Kribbs PJ, Chesnut CH, Kilicoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic populaion. *J Prosthet Dent* 1990;63:86-9.
118. Kribbs, P.J. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent* 1996;63:218-22.
119. Gilles JA, Dallas RM, Holt CS, Bonewald FL. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *J Endodontics* 1997; 23: 419-22.
120. Hildebolt, C.F. *J Gerontol* 1997; 52: 343-51.
121. Jeffcoat MK. Osteoporosis: A possible modifying factors in oral bone loss. *Ann Periodontol* 1998; 3: 312-21.
122. Saville PD. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat; a model of osteoporosis. *J Am Geriatr Soc* 1969;17:155-66.
123. Henri Beltrao Coelho da Paz, Lucien., Jorgetti, Vanda., Hajime Yoshinari, Natalino. Modelos animais de osteoporose. *Rev. Hosp. Clín.Fac. Med.S. Paulo* 1997; 52(2): 86-9.
124. Geddes AD. Animal models of bone disease. In: Bilezican, J *Principles of bone biology* 1996;97:1343-54.
125. Mosekilde L, Weisbrode S et al. Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary restriction and ovariectomy in Sinclair S-1 minipigs: A pilot study. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 1311-21.
126. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT et al. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol* 1988;18: 416-21.
127. Wu DD, Boyd RD, Fix TJ et al: Regional patterns of bone loss and altered bone remodelling in response to calcium deprivation in laboratory rabbits. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 18-23
128. Waters RV, Vickery BH, Avnur Z et al: Bone structure and turnover following treatment of glucocorticoid osteopenia rabbits with RS-66271 and bPTH. *J Bone Miner Res* 1997; 12(Suppl):512-9.
129. Shen V. Birchman R.: Short-term changes in histomorphometric and biochemical turnover markers and bone minerak density in strogen and/or dietary calcium-deficient rats. *Bone* 1995; 16: 146-56.
130. Weinreb M, Rodan GA, Thompson DD. Osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone reabsortion and decreased bone formation. *Bone* 1989; 10: 187-94.
131. Gouveia CHA. Efeito da administração de hormônio tireoidiano na massa óssea de ratas. Sao Paulo 1996. (Dissetação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Univesidade de Sao Paulo).
132. Matsushita M, Tsoyoyama T, Kasai R. Age related changes in bone mass in the senescence-accrated mouse (SAM). SAM-R/3 and SAM-P/6 as new murine models for senile osteoporosis. *Am J Pathol* 1986; 25: 276-83.
133. Simons HA & Kunin AS. Autoradiographic and biochemical investigations of the effect of cortisone on the bones of the rat. *Clin Orthop* 1967; 55: 201-15.
134. Chavassieux P, Pastoreau P, Chapuy M. Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: A biochemical and histomorphometric study. *Osteoporosis Int* 1993; 3: 97-102.
135. Quarles LD.: Prednisone-induced osteopenia in beagles: Variable effects mediated by differential suppression of bone formation. *Am J Physiol* 1992;263:E136-E141.
136. Weinreb M, Rodan, GA, Thompson DD. Immobilization-related bone loss in the rat is increase by calcium deficiency. *Calcif Tissue Int* 1991; 48: 93-100.
137. Adachi JD, Bensen WG, Brown J, et al. Intermittent cyclical etidronate therapy in the prevention of corticosteroid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 1997; 337:382-87.
138. Adachi JD, Saag KG, Delmas PD, et al. Two- year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 2001;44:202-11.
139. Mc Clung M, Geusens P, Miler PD, et al. Effect os risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. *N Engl J Med* 2001;344:333-40.
140. Kanis JA, Johnell O, Gullberg B, et al. Evidence for efficacy of drugs affecting bone metabolism in preventing hip fracture. *Br Med J* 1992;305:1124-8.

141. Santoro NF, Col NF, Eckman MH et al. Hormone replacement therapy -Where are we going? *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1798-812.
142. Documento de la Sociedad Española de Reumatología sobre la osteoporosis postmenopausica. *Rev Esp Reumatol* 2001;28:148-53.
143. Adams JS, Clemens TL, Parrish JA, Holick MF. Vitamin-D synthesis and metabolism after ultraviolet irradiation of normal and vitamin-D-deficient subjects. *N Engl J Med* 1982;306:722-5.
144. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Meunier P. Vitamin D₃ and calcium to prevent hip fractures in elderly women. *N Engl J Med* 1992;327:1637-42.
145. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potencial of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982; 9:257-65.
146. García-Diez E. Injertos y colgajos pediculados, en *Cirugía Oral y Maxilofacial*, (R Martín Granizo) Smithkiline Beechman Ed, Madrid, 1997.
147. Finkelman RD, Hardesty R, Rakijan et al. Increased IGF-II and TGF- β in calvarial bone: Graft survival implications. *J Dent Res* 1992;71:116-20.
148. Cammack GV, Nevins M, Clem DS, et al. Histologic evaluation of mineralized and demineralized freeze-dried bone allograft for ridge and sinus augmentations. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2005;25(3):231-7
149. Paul BF, Horning GM, Hellstein JW, et al. The osteoinductive potential of demineralized freeze-dried bone allograft in human non-orthotopic sites: a pilot study. *J Periodontol*. 2001;72(8):1064-8.
150. Schwartz Z, Somers A, Melloning JT, et al. Ability of comercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol* 1998;69:470-47
151. Iliazarov GA. The tensión-stress effect on the genesis and growth of tisúes. Part I. The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. *Clin Orthop* 1989;238:249-281
152. García AG, Martín MS, Vila PG, Maceiras JL. Minor complications arising in alveolar distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:496-501.
153. Spiekerman H. Atlas de implantología. Ed. Masson, Barcelona, 1995.
154. McKinney RV. Implantes dentales endoóseos. Ed. Mosby. 1993.
155. Jarcho M. Calcium-phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 1981;157:259-78.
156. Eppley BL, Sadove M, German RZ. Evaluation of HTR polymer as a cranio maxillofacial graft material. *Plastic and Reconstructive Surg* 1990; 34: 1085-90.
157. Sanchez MA, Berini L, Gay Escoda C. Los diferentes tipos de hidroxiapatita y sus aplicaciones en la cirugía bucal. *Avances en Odontoestomatología* 1993;9:633-8.
158. Laskin DM. *Cirugí Bucal y Maxilofacial*. Ed. Médica Panamericana. 1987.
159. Kay FJ. Cubiertas de fosfato de calico para implantes dentales. *Clin Odontol North Am* 1992;1:1-18.
160. Kent JN, Finger IM, Larsen H. Biointegrated HA-coated dental implants: 5 years clinical observation. *JADA*1990;12:138-44.
161. Smiler DG, Jonson PW, Lozada JL et al. Injertos para elevación sinusal e implantes endoóseos. *Clin Odontol North Am* 1992;1:155-92.
162. Donohue WB, Mascres C. A comparison of the effects of two hidroxiapatites and metacrilate resin on bone formation in the rat ilium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8:75-82
163. Wagner JR. A 3 ½-year clinical evaluation of resorbable hidroxiapatite OsteoGen (HA Resorb) used for sinus lift augmentations in conjunction with the insertion of endosseous implants. *J Oral Implantol* 1991;2:152-64.
164. Pettis GY, Leonard BK, Glowacki J. Tissue response to composite ceramic hidroxiapatite/demineralised bone implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1990;48:1068-74.
165. Levine SS, Prewett AB, Cook SD. The use of a new form of allograft bone in implantation of osseointegrated dental implants. A preliminary report. *J Oral Implantol* 1992;4:366-71.
166. Kasperk C, Ewwrers R, Simmons B et al. Hidroxiapatita derivada de algas (ficógena). Un estudio histológico comparativo. *Avances en Periodoncia* 1990;2:103-10.
167. Cobb CM, Eick JD, Barker BF, Mosby EL et al. Restotation of mandibular continuity defects using combinations of hidroxiapatite and autogenous bone. Microscopic observations. *J Oral Maxillofac Surg* 1990;48:268-75.
168. Shapoff CA, Alexander DC, Clark AE. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. *Compendium* 1997;18 (4):352-63.
169. Froum SJ, Stahl SS. Human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants II. 13 to 18 months. *J Periodontol* 1987;58:103-9.

170. Kent JN, Block MS. Simultaneous maxillary sinus floor bone grafting and placement of hydroxiapatite-coated implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1989;47:238-42.
171. Plotze AE, Barbosa S, Nasjleti CE et al. Histologic and histometric response to polymeric composite grafts. *J Periodontol* 1993;64:343-48.
172. Pearsall AD, Spears PR, Chokshi M. The ultrastructural architecture of the tissue/hard-tissue replacement interface. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:375-84.
173. Ashman A. Applications of HTR polymer in dentistry. *Compendium* 1988; 9 (Suppl 10):S330-6.
174. Yukna RA. HTR polymer grafts in human periodontal osseous defects I. 6-month clinical results. *J Periodontol* 1990;61:633-42.
175. Isaksson S. Influence of three alloplastic materials on calvarian bone healing. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1993;22:375-81.
176. Ratner BD. Biomaterials surfaces. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 1987;21:59-90
177. Hämerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontology* 2000 1998;17:151-75.
178. Peetz M. Characterization of xenogenic bone material. In: Philip J. Boyne. *Osseous Reconstruction of the Maxilla and the Mandible*. Chicago: Quintessence Books, 1997;87-100
179. Benezra Rosen V, Hobbs LW, Spector M. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxiapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials* 2002;23:921-28.
180. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM et al. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:55-66
181. Brunette DM, Cheroundi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomech Eng* 1999;121:49-57
182. Piatelli A, Manzon L, Scarano A, et al. Histologic and histomorphometric analysis of the bone response to machined and sandblasted titanium implants: An experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:805-10.
183. Acil Y, Terheyden H, Dunsche A, et al. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res* 2000;52:703-10.
184. Zimmermann M, Schlegel AK, Arnold M. Prospektive klinische Studie zur Erfolgssicherheit des bovinen Knochenersatzmaterials Bio-Oss, bei der Defektauffüllung. *Wehrmed Mschr* 1999;43:143-6.
185. Weibrich G, Tretin R, Gnoth SH, et al. Analysis of the size of the specific surface area of bone regeneration materials by gas adsorption. *Mund-Kiefer Gesichts Chir* 2000; 1-5
186. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001;22:1599-606.
187. Benke D, Olah A, Möhler H. Bio-Oss bone substitute contains carbonate but fails to display protein including TGF β . *Biomaterials* 2001;22:1005-12.
188. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for Guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via medicinal products. CPMB/BWP/1230/98
189. European Scientific Steering Committee: Final opinion on the Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (GBR)-Adopted on 6 July 2000
190. Baier RE, Dutton RC. Initial events in interactions of blood with foreign surfaces. *J Biomed Mater Res* 1996;3:191-206.
191. Araújo MG, Carmagnola D, Berglundh T et al. Orthodontic movement in bone defects augmented with Bio-Oss. *J Clin Periodontol* 2001;28:73-80
192. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:117-24.
193. Hämerle CH, Chiantella GC, Karring T, et al. The effect of a deproteinized bovine bone material on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:151-62.
194. Hürzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27:315-20.
195. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part I. Histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol* 2000;71:1015-23.
196. McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, et al. Eighteen-Month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:361-8.

197. Kloss F, Schelegel KA, Schultze-Mosgau S, et al. Clinical and histological findings in sinus augmentations using autogenous and xenogenous materials. *ZZI Abstracts*, p:14, Supplement 2001.
198. Matras H. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1982; 40: 617-21.
199. Matras H. Fibrin Seal: The state of the art. *J Oral Maxillofac Surg* 1985; 43: 605-11.
200. Tawes RL, Syordak GR, Du Vall TB. Autologous fibrin glue: The last step in operative hemostasis. *Am J Surg* 1994; 168: 120-7.
201. Hartman AR, Galankis DK, Honing MP, et al. Autologous whole plasma fibrin gel: Intraoperative procurement. *Arch Surg* 1992; 127: 357-64.
202. Schlag G, Redl H. The influence of fibrin sealant on demineralized bone matrix-dependent osteoinduction. A quantitative and qualitative study in rats. *Clin Orthop* 1989; 238: 282-7.
203. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo -Dias LL. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52(2):161-6.
204. Arbes H, Bösch P, Salzer M. First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting, combined with the fibrine adhesive system (F.A.S). *Arch Orthop Trauma Surg* 1981;98:183-8.
205. Antonaides HN. Human platelet -derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc Nat Acad Sci USA* 1981; 78(12): 7314-7.
206. Antonaides HN, Owen AJ. Growth factors and regulation of cell growth. *Ann Rev Am* 1982; 33: 445-63.
207. Slater M, Patava J, Kinghan K, S Mason. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Ortop Res* 1995; 13: 655-63.
208. Whitman DH, Berry R, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-9
209. Marx R, Carlson E, et al. Platelet-rich plasma. Growth factors enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 85: 638-46.
210. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:429-535.
211. Antonaides HN, Calanopoulos T, Neville-Golden J, Kirsty CH, Lynch SE. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblast. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991;88:565-9
212. Bestholz C, Johnsson A, Helling CH. CDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature* 1986;320:695-6.
213. Sitaras NM, Sariban E, Pantazis P, Zetter B, Antonaides HN. Human iliac afferent endothelial cell express both genes encoding the chains of platelet derived-growth factor (PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen, *J Cell Physiol* 1987;132:376-80.
214. Deuel TF, Huang JS, Profitt RT et al. Human platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1981;256(17):8896-9.
215. Lynch SE, Niwon JC, Colvin RB, Antonaides HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Sinergistic effects with other growth factors. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987;84:7696-700.
216. Raines EW, Ross Russell. Platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1982;237(9):5154-60.
217. Antonaides HN, Hunkapiller MW. Human platelet-derived growth factor (PDGF): Aminoterminal aminoacid sequence. *Science* 1983;220:963-5.
218. Helling CH, Westmark B. Platelet-derived growth factors: A family of isoforms that bind to two distinct receptors. *Br Med Bull* 1989;45(2):453-464.
219. Graves DT, Cochran DL. Mesenchymal cell growth factors. *Critical Rev Oral & Biological Med* 1990;88:1-11.
220. Piche JE, Carnes DL Jr, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontitis. *J Dent Res* 1989;68:761-7.
221. Zhang FJ, Leeman E, Carnes DC, Graves DT. Human osteoblast synthesize and respond to platelet derived growth factor. *Am J Physiology* 1991;261:348-54.
222. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemostatic, synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992;63:515-25.

223. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993;64:142-8.
224. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GGJ, Ritmen B, Caffese RG. Differential effect of TGF- β -1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblast. *J Periodontol* 1994;65:641-8.
225. Boyan LA, Bhargava G, Nishimura F, Orman R, Price R, Terranova VP. Mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to different isoforms of platelet derived growth factor. *J Dent Res* 1994;73:1593-1600
226. Hock JM, Cannalis E. Platelet- derived growth factor enhances bone cell replication but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology* 1994;134:1423-28.
227. Saygin NE, Triyasu Y, Giannobile WV et al. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol* 2000;71:1591-1600
228. Nishimura JF, Terranova VP. Comparative study of the chemostatic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblast to polipeptide growth factors. *J Dent Res* 1996;75:986-92.
229. Bartold PM, Raben A. Growth factors modulation of fibroblasts in simulated wound healing. *J Periodontal Res* 1996;31:205-16.
230. Anderson TJ, Lapp CA, Billman MA, Schuster GS. Effects of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor on human gingival fibroblasts grown in serum-containing and serum-free medium. *J Clin Periodontol* 1998;25:48-55.
231. Sprugel K, McPherson J, Clowes A, Ross R. Effects of growth factors in vivo. *Am J Pathol* 1987;129(3):601-13.
232. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Antoniadis NH. A combination of platelet derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Periodontol* 1989;16:545-8.
233. Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams RC, Kiritsy Ch P, Howell H, Reddy MS, Antoniadis HN. The effects of short- term application of a combination of platelet derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991;62:458-67.
234. Lynch SE, Buser D, Hernández RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration. Around titanium dental implants. Results of a pilot study in Beagle dogs. *J Periodontol* 1991;62:710-6.
235. Sloan P. Current concepts of the role of fibroblast and extracellular matrix in wound healing and their relevance to oral implantology. *J Dent* 1991;19:107-9.
236. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Cafesse R, Donath K, Sánchez R. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol* 1992;63:929-40.
237. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Tucker NM, Charette MF. Platelet derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodont Res* 1992;27:285-90.
238. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker NM, Charette MF. Platelet derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 1993;20:537-544.
239. Wang HL, Pappen TD, Castelli WA, Chiego DJ Jr, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet derived growth factor on the cellular response of periodontium: an autographic study on dogs. *J Periodontol* 1994;65:429-36.
240. Cho MI, Matsuda N, Ramakrishnan PR, Lin W, Genco RJ. Differential regulation of periodontal ligament cells activities by platelet derived growth factor, insulin like growth factor-I and epidermal growth factor. En Genco RJ, Hamda S, Lehner T, McGhee J, Mengenhagen S (eds). *Molecular pathogenesis of periodontal disease*. 1994:403-14. Washington DC: America Society for Microbiology.
241. Park JB y cols. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet derived growth factor. *J Periodontol* 1995;66:522-30.
242. Cho LI, Lin WL, Genco RJ. Platelet derived growth factor modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995;66:522-30.
243. Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and nonhuman primate animal models for periodontal regenerative therapy. Results following a single administration of PDGF/iGF-I. *J Periodontol* 1994;65:1158-68.

244. Giannobile WV, Hernández RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiristy CP, D'Andrea M, Lynch SE. Comparative effects of platelet derived growth factor-BB and insuline like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Priodontal Res* 1996;31:301-12.
245. Green RJ, Usui ML, Hart CE, Ammons WF, Narayanan AS. Immunolocalization of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF- α and β receptors in human gingival wounds. *J Periodont Res* 1997;32:209-14.
246. Gamal AY, Mailhot JM, Garnick JJ, Newhouse R, Sharawy MM. Huamn periodontal ligament fibroblast response to PDGF-BB and IGF-I application on tetracycline HCl conditioned root surfaces. *J Clin Periodontol* 2000;27:347-53.
247. Kasaca SC, Soory M. The effect of PDGF, TGF- β and IGF in combination on androgen metabolism by fibroblast. *J Clin Periodontol* 1998;25:640-6.
248. Zaman KU, Sugaya T, Kato H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein -2 application to desmineralized dentin on early periodontal ligament cell response. *J Periodontont Res* 1999;34:244-50.
249. Yong-Moo Lee et al. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol* 2000;71:418-24.
250. Gamal AY, Mailhot JM. The effect of local delivery of PDGF-BB on attachment of human periodontal ligament fibroblasts to periodontitis-affected root surfaces-in vitro. *J Clin Periodontol* 2000;27:347-53.
251. Munford JH, Carnes DL, Cochran DL, Oates TW. The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells an in vitro wound model. *J Periodontol* 2001;72:331-40.
252. Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol* 2001;72:815-23.
253. Clemmonds DR. Structural and functional analysis of insulin-like growth factors. *Br Med Bull* 1989;45:465-80.
254. Butler AA, Le Roith D. Mini review: tissue specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 2001;142:1685-8.
255. Thrailkill KM, Siddhanti SR, Folwkes JL et al. Differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts is associated with temporal changes in the expression of IGF-1 and IGF-BPs. *Bone* 1995;17:307-13.
256. Bickle DD, Harris J, Halloran BO et al. Expression of the genes for insulin-like growth factors and their receptors on bone during skeletal growth. *Am J Phisiol* 1994;267:E278-86.
257. Koch G. Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *J Periodont Res* 1988;23:107-17.
258. Bloom S, Holmstrup P. The effect of insulin like growth factor-I and human growth hormone on periodontal ligament fibroblastic morphology growth pattern, DNA synthesis and receptor binding. *J Periodontol* 1992;63:960-8.
259. Rutherford RB, Trailsmith MD. Synergistic effects of dexamethasone on platelet derived growth factor mitogenesis in vitro. *Arch Oral Biol* 1992;37:139-45.
260. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW et al. A phase I/II trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontal Res* 1997;68:1168-93.
261. Gospodarwicz D, Neufeld G. Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol Supple* 1987;5:15-26.
262. Caffesse R, Quiñones CR. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 1993;1:69-79.
263. Hauschka PV, Mavrakos AE. Growth factors in bone matrix isolation of multiple types by affinity chromatography on hepain-septanose. *J Biol Chemistry* 1986;261:12665-74.
264. Terranova VP, Odziemiec C. Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endotelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. *J Periodontol* 1989;60:293-301.
265. Tweden KS, Spadone DP et al. Neovascularization of surface demiralized dentin. *J Periodontol* 1989;60:460-6.
266. Eppley BL, Connolly DT et al. Free bone graft reconstruction of irradiated facial tissue: Experimental effects of basic fibroblast growth factor stimulation. *Plastic Reconst Surg* 1991;88:1-11.
267. Schliephake H, Newkam FW. The use of basic fibroblast growth factor for enhancement of bone in growth into pyrolyzed bovine bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10:181-6.
268. Takayama S, Murakami S et al. Effect of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 1997;32:667-75.

269. Sasaki T, Maita E, et al. Increased bFGF level in the serum of patients with phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1998;25:42-7.
270. Hosokawa R, Kikuzaki K, et al. Controlled local application of basic fibroblast growth factors (FGF-2) accelerates the healing GBR. *Clin Oral Impl Res* 2000;11:345-53.
271. Rossa C, Marcantonio E. Regeneration of class III furcation defects with basic fibroblast growth factors (b-FGF) associated with GTR. A descriptive and histometric study in dogs. *J Periodontol* 2000;71:775-84.
272. McCracken M, Lemons J. Analysis of Ti-6Al-4V implants placed with fibroblast growth factor 1 in rat tibiae. *J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:495-502.
273. Bennet NT, Schulz GS. Growth factors and wound healing: part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993;166:74-81.
274. Booth V, Young S, et al. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodont Res* 1998;33:491-9.
275. Cornellini R, Artese L. Vascular endothelial growth factor and microvessel density around healthy and failing dental implants. *J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:389-93.
276. Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:1317-21.
277. Bestholz CH, Jonson A et al. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor. A-chain and its expression in tumor cell lines. *Nature* 1986;320:670-95.
278. Thesleff I. Epithelial cell rest of Malassez bind epidermal growth factor intensely. *J Periodont Res* 1987;22:419-21.
279. Cho ML, Garant PR, Lee YL. Periodontal ligament fibroblasts, preosteoblasts, and prechondrocytes express for epidermal growth factor in vivo: a comparative radioautographic study. *J Periodont Res* 1988;23:287-94.
280. Modéer T, Andersson G. Regulation of epidermal growth factor receptor metabolism in gingival fibroblasts by phenytoin in vitro. *J Oral Pathol Med* 1990;19:1188-91.
281. Hormia M, Thesleff I, et al. Increased rate of salivary epidermal growth factor secretion in patients with juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1993;101:138-44.
282. Burgess AW. Epidermal growth factor and transforming growth factor. *Br Med Bull* 1989;45:401-24.
283. Jin Gao, Symons AL, Bartold MP. Expression of transforming growth factor- β receptors types II and III within various cells in the rat periodontium. *J Periodont Res* 1999;34:113-22.
284. Derynck R, Jarret JA, et al. The murine transforming growth factor- β precursor. *J Biol Chem* 1986;261:4337-79.
285. Chien HH, Lin WL, Cho MI. Expression of TGF- β isoforms and their receptors during mineralised nodule formation by rat periodontal ligament cells in vitro. *J Periodont Res* 1999;34:301-9.
286. Joo L, Carnes L. Effect of transforming growth factor- β on osteoblast cells cultured on 3 different hydroxyapatite surfaces. *J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:217-25.
287. Adamo T, Mailhot J. Connexin-43 expression in oral-derived human osteoblasts after transforming growth factor- β and prostaglandin E₂ exposure. *J Oral Implantology* 2001;27:25-31.
288. Bosh C, Melsen B, Gibbons R, et al. Human recombinant transforming growth factor. β 1 in healing of calvarial bone defects. *J Craniofac Surg* 1996;7:300-10.
289. Pack M, Kardos TB. The effect of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) on wound healing, with or without barrier membranes, in a class II furcation defect in sheep. *J Periodont Res* 1998;33:335-44.
290. Steinvoll S, Halstensen TS, Schenck K. Extensive expression of TGF- β 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol* 1999;26:366-73.
291. Ruskin JD, Hardwick R, et al. Alveolar ridge repair in a canine model using rhTGF- β 1 with barrier membrane. *Clin Oral Impl Res* 2000;11:107-15.
292. Hong L, Tabata Y, Niyamoto S, et al. Promoted bone healing at a rabbit skull gap between autologous bone fragment and the surrounding intact bone with biodegradable microspheres containing transforming growth factor. β 1. *Tissue Eng* 2000;6:331-40.
293. Yamamoto M, Tabata Y, Hing L. Bone regeneration by transforming growth factor- β 1 released from a biodegradable hydrogel. *J Controlled Release* 2000;64:133-42.
294. Green CJ, Knight J, Precious S et al. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Lab Anim*. 1981;15(2):163-70.
295. Nutrient Requirements of Rabbits. Second revised edition. National Academy of Sciences. Washington DC, 1977.

296. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(6):631-6.
297. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982;11(4):318-26.
298. Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional histology.* Chuechill Livingstone Ed. 2ª Ed. New York, 1987.
299. Christiansen C: Skeletal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1993; 8 (suppl 2):S475-80.
300. Chesnut CH III, McClung MR, Ensrud KE et al. Alendronate treatment of the postmenopausal osteoporotic woman: Effect of multiple dosages on bone mass and bone remodelling. *Am J Med* 1995;99:144-52.
301. Payne JB, Zachs NR, Reinhardt et al. The association between estrogen status and alveolar bone density changes in postmenopausal women with a history of periodontitis. *J Periodontol* 1997;68:24-31.
302. Kanis JA. *Osteoporosis.* Blackwell Sciece Ltd, Oxford, 1996.
303. Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogenic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:53-8.
304. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998;13:310-6.
305. Schmith JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop* 1986: 299-308.
306. Vikjaer D, Blom s, Hjorting-Hansen E, et al. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(1):59-66.
307. Torres J. Evaluación de la regeneración ósea mediante aplicación de PRP en un modelo experimental animal. DEA. 2002. U.C.M.
308. Roberts E. Bone Tissue Interface. *J Dental Educat* 1988;52:804-9.
309. Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogenic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(6):795-806.
310. Dunstan CR, Boyce R, Boyce BF et al. Systemic administration of acidic fibroblast growth factor (FGF-1) prevents bone loss and increases new bone formation in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1999;14:953-9.
311. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004;34(4):665-71.
312. Fontana S, Olmedo DG, Linares JA, et al. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent.* 2004;13(1):73-8.
313. Roldan JC, Jepsen S, Miller J, et al. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs bone morphogenetic protein-7. *Bone.* 2004;34(1):80-90.
314. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk E et al. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)- an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 2005;15:2575-84.
315. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, et al. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials.* 2004 Oct;25(23):5387-93.
316. Hammerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(2):167-74.
317. Pallesen L, Schou S, Aaboe M et al. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(4):498-506.
318. Schmid J, Wallkamm B, Hammerle CH et al. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(3):244-8.
319. Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I--Background and processing techniques. *J Oral Implantol.* 2001;27(1):38-42.
320. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-8.
321. Kilian O, Flesch I, Wenisch S et al. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *Eur J Med Res.* 2004;30;9(7):337-44.

322. Lozano M, Estebanell E, Cid J et al. Platelet concentrates prepared and stored under currently optimal conditions: minor impact on platelet adhesive and cohesive functions after storage. *Transfusion* 1999;39:951-9.
323. Gruber R, Varga F, Fisher MB et al. Platelets stimulate proliferation on bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Impl Res* 2002;13:529-35.
324. Soffer E, Ouhayoun J-P, Dosquet C et al. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:581-8.
325. Lindholm TS, Gao TJ. Functional carriers for bone morphogenetic proteins. *Ann Chir Gynaecol* 1993; Suppl 207:3-12.
326. Zellin G, Beck S, Hardwick R et al. Opposite effects of recombinant human transforming growth factor beta-1 on bone regeneration in vivo: effects of exclusion of periosteal cells by microporous membrane. *Bone* 1998;22:613-20.
327. Blanquaert F, Saffar JL, Colombier ML et al. Heparan-like molecules induce the repair of skull defects. *Bone* 1995;17:499-506.
328. Li RH, Wozney JM. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotechnol* 2001;19:255-65.
329. Weibrich G, Hansen W, Kleis W et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004;665-71.
330. Ziv Mazor, Peleg M, Garg AK, et al. Platelet rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dent* 2004;13:65-72.
331. Kassolis J, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000;71:1654-61.
332. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis: a preliminary result of three cases. *Bone* 2004;35:892-8.
333. Basa S, Varol A, Turker N. Alternative bone expansion technique for immediate placement of implants in the edentulous posterior mandibular ridge: a clinical report. *Int J Maxillofac Implants* 2004;19:554-8.
334. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, et al. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):357-62.
335. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP versus PCCS System. *Int J Maxillofac Implants* 2002;17:184-90.
336. Weibrich G, Kleis WK, Buch R, et al. The harvest smart PreP system versus the Friadent-Schülte platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Impl Res* 2003;14:233-9.
337. Weibrich G, Hanse T, Kleis WK, et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(1):118-23.
338. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G et al. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002;30(2):97-102.
339. Zimmermann R, Jakubietz M, Jakubietz E et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors to local application. *Transfusion* 2001;41:1217-24.
340. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, et al. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(1):60-70.
341. Lu L, Yasemski MJ, Mikos AG. TGF-beta1 release from biodegradable polymer microparticles: its effects on marrow stromal osteoblast function. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S82-91.
342. Park YJ, Lee YM, Lee JY et al. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *J Control Release*. 2000;67(2-3):385-94.
343. Canalis E. Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism*. 1983;32(1):14-20.
344. Giannobile WV, Whitson SW, Lynch SE. Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. *J Dent Res*. 1997;76(9):1569-78.

345. Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM et al. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *J Craniofac Surg.* 2003;14(3):292-300.
346. Hartman AR, Galanakis DK, Honing MP, et al. Autologous whole plasma fibrin gel; Intraoperative procurement. *Arch Surg* 1992;127:357-9.
347. Landesberg R, Martin Roy, Glickman R, et al. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(3):297-300; discussion 300-1.
348. Cmolik BL, Spero JA, Magovern GJ, et al. Redo cardiac surgery: late bleeding complications from topical thrombin-induced factor V deficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;105(2):222-7.
349. Spero JA. Bovine thrombin-induced inhibitor of factor V and bleeding risk in postoperative neurosurgical patients. Report of three cases. *J Neurosurg.* 1993; 78(5):817-20.
350. Landesberg R, Burke A, Pinsky D, et al. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63(4):529-35.
351. Tsay RC, Jennifer V, Burke A, et al. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(4):521-8.
352. Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol.* 2005 Feb;123(2):172-83.
353. Simion M, Trisi P, Piatelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *Int J Periodont Rest Dent* 1994;14:497-511.
354. Jovanovic SA, Schenk RK, Orsini M et al. Supracrestal bone formation around dental implants: An experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10:23-31.
355. Tinti C, Parma-Benfenati S, Polizzi G. Vertical ridge augmentation. What is the limit?. *Int J Periodont Res Dent* 1996;16:221-9.
356. Simion M, Jovanovic SA, Tinti C et al. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. *Clin Oral Impl Res* 2001;12:35-45.
357. Jensen OT, Greer RO, Johnson L. Vertical ridge augmentation bone-graft augmentation in a new canine mandibular model. *Int J Maxillofac Implants* 1995;10:335-44.
358. Schliephake H, Dard M, Planck H et al. Alveolar ridge repair using resorbable membranes and autogenous bone particles with simultaneous placement of implants: an experimental pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:364-73.
359. Schmid J, Hämmerle CHF, Stich et al. Supraplant, a novel implant system based on principle of guided bone regeneration. A preliminary study in the rabbit. *Clin Oral Impl Res* 1991;2:199-202.
360. Sanchez AR, Eckert SE, Sheridan PJ et al. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. *J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:526-32.
361. Aghaloo T, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 ;60(10):1176-81.
362. Slotte C, Lundgren D. Augmentation of calvarial tissue using non-permeable silicone domes and bovine bone mineral. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(6):468-76.
363. Schmid J, Hämmerle CHF, Flückiger L, et al. Blood-filled spaces with and without filler materials in guided bone regeneration. A comparative experimental study in the rabbit using bioresorbable membranes. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(2):75-81.
364. Young C, Sandstedt P, Skoglund A. A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(1):72-6.
365. Schmitt JM, Buck DC, Joh SP, et al. Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-sized defects. *J Periodontol.* 1997; 68 (11):1043-53.
366. Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogeneic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(6):795-806.
367. Hockers T, Abensur D, Valentini P, et al. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(6):487-98.
368. Klinge B, Alberius P, Isaksson S. Contribution of autogeneic membranous bone chips and bone paste to healing of rabbit skull defects. *Scand J Dent Res.* 1992;100(5):274-8.

369. Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S, et al. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16(1):23-33.
370. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, et al. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int Orthop.* 2005;29(2):67-72.
371. Thaller SR, Hoyt J, Dart A, et al. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *J Craniofac Surg.* 1994;5(4):242-6.
372. Terheyden H, Jepsen S, Moller B, et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(6):510-21.
373. Taylor JC, Cuff SE, Leger JP, et al. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(3):321-30.
374. Schlegel KA, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, et al. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(1):53-8.
375. Zaffe D, Leghissa GC, Pradelli J, Boticelli AR. Histological study on sinus lift grafting by Fisiograft and Bio-Oss. *J Mater Sci Mater Med.* 2005 Sep;16(9):789-93.
376. Pinholt EM, Bang G, Haanaes HR. Alveolar ridge augmentation by osteoinductive materials in goats. *Scand J Dent Res.* 1992 Dec;100(6):361-5.
377. Klinge B, Alberius P, Issaksson S, Jönsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Mar;50(3):241-9.
378. Duda M, Pajak J. The issue of bioresorption of the Bio-Oss xenogeneic bone substitute in bone defects. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med].* 2004;59(1):269-77.
379. Skoglund A, Hissing P, Young C. A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997 Mar-Apr;12(2):194-9.
380. Schlegel AK, Donath K. BIO-OSS--a resorbable bone substitute? *J Long Term Eff Med Implants.* 1998;8(3-4):201-9.
381. Zechner W, Tangi S, Tepper G, et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(1):15-22.
382. Aghaloo T, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 ;60(10):1176-81.
383. Fuerst G, Gruber R, Tangi S, et al. Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(5):685-90.
384. Fontana S, Olmedo DG, Linares JA, et al. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent.* 2004;13(1):73-8.
385. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, et al. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials.* 2004 Oct;25(23):5387-93.
386. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, et al. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Oct;15(5):589-97.
387. Wojtowicz S, Chaberek L, Kryst E et al. Fourier and fractal analysis of maxillary alveolar ridge repair using platelet rich plasma (PRP) and inorganic bovine bone. *Int J Oral and Maxillofac Surg* 2003;32:84-6.
388. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Jan-Feb;18(1):93-103.
389. Rosemberg ES, Torosian J. Sinus grafting using platelet-rich plasma: Initial case presentation. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 2000;843-850.
390. Obarrio JJ, Arauz-Dutari TI, Chamberlain JM, et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000 Oct;20(5):486-97.
391. Shamanan R, Filstein M, Danesh-Meyer M. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001;21(4):345-55.
392. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(5):555-8.

393. Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Sep;59(9):1119-21.
394. Jakse N, Tangl S, Gilli R, et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(5):578-83.
395. Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(1):48-55.
396. Choi B-H, Im C-J, Huh J-J, et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33 (1):56-9.
397. Marden L, Fan R, Pierce G, et al. Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. *J Clin Invest.* 1993;92(6):2897-905.
398. Kim S-G, Chung C-H, Kim Y-K, et al. 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;17(1):86-94.
399. Kim S-G, Kim W-K, Park J-C, et al. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(9):1018-25.
400. Demiralp B, Kecely G, Munhtarogullari M, et al. Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet-rich plasma and tricalcium phosphate: a case report. *J Endod.* 2004;30(11):796-800.
401. Suba Z, Takacs D, Gyulai-Gaal S, et al. Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19(6):832-8.
402. Wiltfang J, Schlegel KA, Schlitz-Mosgau S, et al. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14 (2) : 213-8.
403. Wiltfang J, Kloss FK, Kessler P, et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(2):187-93.
404. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002;22(1):45-53.
405. Rodriguez A, Anastassov GE, Buchbinder D, et al. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61(2):157-63.
406. Fuerst G, Gruber R, Tangl S, et al. Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(3):301-7.
407. Roldan JC, Jepsen S, Schmidt C, et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(6):716-23.
408. Roldan JC, Jepsen S, Miller J, et al. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs bone morphogenetic protein-7. *Bone* 2004;34(1):80-90.
409. Fuerst G, Gruber R, Tangl S, et al. Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(3):301-7.