

Comparación entre diferentes rellenos óseos y membranas reabsorbibles mediante microtomografía de alta resolución. Estudio preliminar en conejos

Comparison between different bone fillers and reabsorbable membranes using high resolution micro-tomography. Preliminary study in rabbits

Presentado: 23 de marzo de 2017

Aceptado: 10 de julio de 2017

Guillermo E. Dedossi,^a Martín G. Benassi,^a Leonardo Uribe Echeverría,^a Ismael Rodríguez,^b Enrique Fernández Bodereau^{a,c}

^aCarrera de Especialista en Prótesis e Implantología;

^bCátedra de Histología;

^cCátedra de Clínica de Prótesis y Carrera de Especialista en Prótesis e Implantología; Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Resumen

Objetivo: Evaluar el comportamiento de diferentes membranas y materiales para relleno óseo en defectos críticos, en calotas de conejos, mediante microtomografía.

Materiales y métodos: En 12 conejos machos de 3 kg se realizaron 4 defectos en la calota craneana, de espesor óseo total. Se los dividió aleatoriamente en tres subgrupos según el tipo de membrana de barrera utilizada. Los defectos se rellenaron con hueso bovino desproteínizado particulado Bio-Oss® (Geistlich-Pharma AG, Wolhusen, Suiza), con hidroxiapatita humana particulada MinerOss® (BioHorizons, Birmingham, AL, Estados Unidos), y con material dentario particulado (Banco de tejidos de Inbiomed S.A., Córdoba, Argentina); el cuarto defecto no se rellenó. Algunos de los especímenes fueron sacrificados a las 4 semanas, y otros, a las 8 semanas. Los niveles de mineralización se evaluaron con microtomografía de alta resolución.

Resultados: Los mayores porcentajes de mineralización (media) se registraron al considerar las membranas amniocoriónicas (83,63%), seguidas de las de colágeno (81,44%) y, finalmente, de las membranas fascia lata (80,63%), pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), por lo que se agrupó a todas estas membranas en un

único subconjunto homogéneo (tabla 7). Los sitios injertados con diente descelularizado (96,83%) y Bio-Oss (88,42%) arrojaron los porcentajes de mineralización más elevados, pero sin diferenciarse significativamente entre sí (subconjunto 2); en tanto que MinerOss registró porcentajes de mineralización bajos (76% de media), con valores levemente superiores a los del grupo de cavidades sin relleno agregado (70,33%), por lo que la diferencia entre estos no resultó significativa (subconjunto 1). Cabe aclarar que los materiales del subconjunto 1 se diferenciaron significativamente de los del grupo 2 (tabla 4).

Conclusiones: Las tres membranas utilizadas no mostraron diferencias estadísticas entre sí en ninguno de los dos períodos de tiempo. Sí hubo diferencias estadísticas entre los materiales de relleno utilizados; los defectos tratados con diente particulado y con hueso bovino desproteínizado evidenciaron gran cantidad de material calcificado, mientras que los defectos tratados con hidroxiapatita humana y los que no fueron rellenados mostraron menor cantidad.

Palabras clave: Amniótica, colágeno, diente particulado, fascia lata, hidroxiapatita, hueso, membranas, microtomografía, regeneración, sustitutos óseos.

Abstract

Aim: To evaluate the behavior of different membranes and materials for filling bone critical defects in rabbits by micro-tomography.

Materials and methods: Four defects were prepared in the cranial cap of 12 3 kg male rabbits of 3 kg, of including total bone thickness. They were randomly divided into three

subgroups according to the type of barrier membrane to be used. The defects were filled with the deproteinized bovine bone particulate Bio-Oss® (Geistlich-Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), with particulate human hydroxyapatite Miner-Oss® (BioHorizons, Birmingham, AL, USA), with particulate dental material (Tissue Bank Foundation, Inbiomed S.A., Córdoba, Argentina), and the last one was left without the addition of filler material. The animals were sacrificed at 4 and 8 weeks. Levels of mineralization were assessed by high resolution micro-tomography.

Results: The highest percentages of mineralization (average) were recorded considering the amnio-cornic membranes (83.63%) followed by collagen (81.44%) and finally the fascia lata membranes (80.63%), but the differences were not statistically significant ($p > 0.05$) and all membranes could be grouped into a single homogeneous subset (table 7). The sites grafted with decellularized tooth (96.83%) and Bio-Oss (88.42%), recorded the highest percentages of mineralization,

but did not differentiate significantly from each other (subset 2). MinerOss showed low percentages of mineralization (76%), with values slightly higher than those recorded in the group of cavities without added filler (70.33%), so that the difference between them was not significant (subset 1). It should be noted that the materials of subset 1 differed significantly from those of group 2 (table 4).

Conclusions: The three membranes used did not show statistical differences between them, in any of the two time periods used. There were statistical differences between the filling materials evidencing the presence of a large quantity of calcified material in the defects treated with particulate tooth and with deproteinized bovine bone and while smaller amounts of calcified material was registered in the case of defects treated with human hydroxyapatite and those that were not treated.

Key words: Amniotic, bone, bone substitutes, collagen, fascia lata, hydroxyapatite, membranes, micro-tomography, particulate tooth, regeneration.

Introducción

En numerosas ocasiones, la colocación de implantes dentales se ve afectada por la presencia de defectos en el reborde alveolar. Cuando los defectos en la cortical ósea vestibular de los rebordes son grandes, comprometen la instalación de los implantes y su rehabilitación estética.¹

Existen muchas técnicas para la reparación de los defectos óseos; estas pueden emplear injertos autólogos, xenográficos, alográficos y aloplásticos, con o sin membrana de barrera. Aunque el injerto de hueso autólogo sigue siendo considerado el *gold standard* –dadas sus propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y su seguridad biológica–, este va asociado a un cierto grado de morbilidad extra y a la cantidad que se puede obtener.

La dentina y el hueso tienen componentes similares: 10% de líquido, 20% de materia orgánica y 70% de minerales, principalmente hidroxapatita, aparte de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de crecimiento ligados a insulina (IGF)-II, y factores de crecimiento transformadores (TGF)-B; además, el cemento contiene TGF-I y colágeno de tipo I y tipo III.²⁻⁶

El potencial osteoinductivo fue descubierto en 1967; desde entonces, diferentes líneas de estudio en animales han mostrado que la matriz de dentina desmineralizada induce la formación de hueso ectópico en localizaciones subcutáneas y en bolsillos intramusculares en roedores.⁷⁻⁹

Contrariamente, Kadkhodazadeh *et al.*, en un estudio en perros, evidenciaron que los autoinjertos

frescos de dentina y cemento mineralizados tienen poco o ningún efecto sobre la inducción de hueso nuevo en el alvéolo dentario posextracción.

El propósito del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de diferentes membranas y materiales para relleno óseo en defectos críticos en calotas de conejos. El comportamiento de los materiales en estudio se analizó mediante microtomografía de alta resolución.

Materiales y métodos

El presente estudio cuenta con el aval del Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, protocolo N° 148/12, y con la autorización –por parte del director del Centro Regional Entre Ríos del INTA– para su realización en las instalaciones de la Estación Experimental Agropecuaria Paraná.

El grupo de estudio estuvo integrado por 12 conejos machos de la variedad “conejo para producción de carne neozelandés o californiano”, con un peso promedio de 3 kg.

Se establecieron tres subgrupos en función del tipo de membrana de barrera que se utilizó, según el siguiente detalle: 1^{er} subgrupo, 4 especímenes con membranas reabsorbibles de colágeno bovino reconstituido de cadenas entrecruzadas Mem-Lok® (BioHorizons, Birmingham, AL, Estados Unidos); 2^o subgrupo, 4 especímenes con membranas de fascia lata humana (Banco de tejidos de Fundación Biotar, Rosario, Argentina); 3^{er} subgrupo, 4 especímenes con

membranas amniocoriónicas humanas (Banco de tejidos de Inbiomed S.A., Córdoba, Argentina).¹⁰⁻¹⁴

En todos los especímenes se procedió a realizar 4 defectos críticos de 6 mm de diámetro en la calota craneana –2 en zona frontal derecha e izquierda, y otros 2 en zona parietal derecha e izquierda–, de espesor total, con trefina y guía quirúrgica^{15,16} (figs. 1-3).

Los animales fueron premedicados con 0,4 ml de xilacina y anestesiados con 0,3 ml de ketamina y 0,2 ml de dexametasona –todo de forma parenteral–, más 0,2 ml de xilacina de forma endovenosa, en la vena auricular, con lo que se obtuvo de 30 a 40 minutos de anestesia general en los especímenes.¹⁷

Se procedió a rasurar el pelo de la calota craneal de los especímenes con cortapelo eléctrico y a desinfectar la piel con solución de povidona yodo (10 g / 100 ml).

Se inició la cirugía con una incisión, con hoja de bisturí # 15, de forma semicircular, con su concavidad en dirección caudal, cortando piel, tejido subcutáneo y periostio. La incisión se extendió desde 1 cm caudal del arco superciliar derecho a 1 cm caudal del arco superciliar izquierdo. Se procedió a levantar un colgajo de espesor total, sostenido por el primer ayudante mediante un separador ancho tipo Cawood.

Para posicionar en la calota craneana la guía quirúrgica que define la localización de los defectos, se realizó una perforación de espesor parcial con una fresa redonda # 6 en la conjunción de la sutura media craneal con la sutura frontoparietal, donde se insertó el pin guía de la guía quirúrgica.

En cada calota craneal expuesta se generaron 4 defectos con trefina, de 6 mm de diámetro, a baja velocidad (150 rpm) y con irrigación continua de suero fisiológico. No se practicó la trepanación de la totalidad del espesor óseo, sino solamente de la cortical externa y el esponjoso, incidiendo sin cortar completamente la cortical interna para no lesionar la duramadre. El corte de la cortical interna se terminó de realizar con bisturí # 11; luego se retiraron los bloques óseos incididos (de espesor total) con bisturí # 11 y cureta de Molt de 3 mm de diámetro.

En todos los especímenes se siguió este patrón: uno de los defectos se rellenó con hueso bovino desproteinizado Bio-Oss® (Geistlich-Pharma AG, Wolhusen, Suiza) esponjoso, gránulos de 0,25 a 1 mm, hidratado con suero fisiológico; otro, con hueso humano calcinado (hidroxiapatita humana) MinerOss® (BioHorizons, Birmingham, AL, Estados Unidos) Cortical & Cancellous Chips, hidratado con suero fisiológico; el tercero, con material dentario molido, descelularizado y deshidratado (Banco de tejidos de

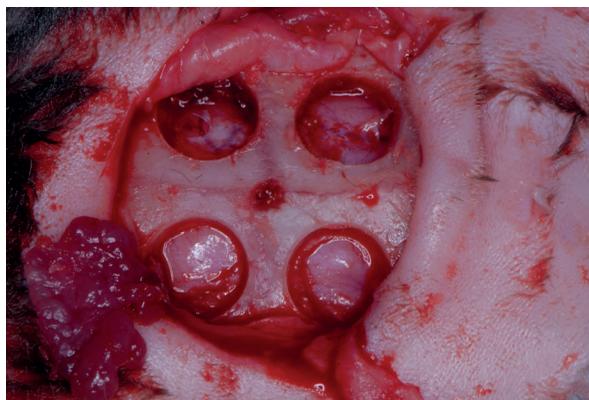


Figura 1. Defectos óseos generados.



Figura 2. Defectos rellenos con biomateriales.



Figura 3. Defectos cubiertos por membrana.

Inbiomed S.A., Córdoba, Argentina), partículas de 210 a 1000 μm , hidratado con suero fisiológico; y el cuarto defecto se dejó vacío, como control negativo.¹⁸⁻²¹

A los especímenes del primer grupo se les colocó sobre la calota y los defectos una membrana reabsorbible de colágeno bovino reconstituido de cadenas entrecruzadas, sin fijación adicional. A los del segundo, una membrana de fascia lata humana, sin fijación adicional. Y a los del tercero, una membrana amniocoriónica humana, sin fijación adicional.¹²⁻¹⁶

Se procedió a la reposición del colgajo y se suturó con náilon 3.0, realizando cuatro suturas dobles tipo colchonero horizontal por fuera y entre estos 5 puntos simples.

Luego de la cirugía, se le administró a cada espécimen una dosis de 1 ml de penicilina más estreptomomicina (2.5000.000 UI) cada 48 horas en 3 aplicaciones, más 0,2 ml de dexametasona posquirúrgico, todo intramuscular.

Luego de operados, los especímenes permanecieron en el Área de Cunicultura del INTA Paraná, en jaulas individuales, con dieta de alimento balanceado y agua.

Tras cuatro semanas, se procedió al sacrificio de la mitad de los especímenes de la siguiente forma: concusión y exanguinación.²⁷

Se retiró la calota craneal con periostios mediante disco de corte, y se etiquetaron y fijaron las muestras en formol al 0,4%.

A ocho semanas de la cirugía, se sacrificó a la totalidad de los especímenes intervenidos siguiendo el protocolo antes descripto, se retiraron las calotas craneales, y se etiquetaron y fijaron para la realización de los análisis microtomográficos (fig. 4).

Estudios microtomográficos. Las muestras fijadas, trozadas y marcadas fueron derivadas al laboratorio LIIFAMIR de la Facultad de Astronomía, Matemática y Física de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Cada muestra fue sometida a estudio microtomográfico de alta resolución, en el que se utilizó como fuente de radiación un tubo convencional de rayos X con potencia de 3 kW de alta estabilidad (Siemens Kristalloflex®, Alemania). El sistema de posicionamiento es un dispositivo mecánico-electrónico de control automatizado, con grados de libertad sincronizados. La detección se llevó a cabo de manera digital y directa, con un detector de alta resolución de tipo flat-panel certificado Pax-Scan® modelo 2020 (Varian, Salt Lake City, UT, Estados Unidos). El procesamiento de datos se realizó con la licencia oficial 3407-8985-4332-9223-7919 de la plataforma MatLab (The Math Works®, Natick, MA, Estados Unidos) (fig. 5).

El estudio de las muestras abarcó la totalidad de las dimensiones. Se tomaron imágenes radiológicas bidimensionales para pasos de 0,45 grados, obteniendo 800 proyecciones en 2λ para reconstrucción tomográfica completa de cada muestra. Se utilizaron filtros de Zr y Al con el objetivo de eliminar los fotones de baja energía.

Junto a cada muestra estudiada se posicionó un tubo con agua desmineralizada, a fin de obtener un

patrón conocido que permitiera estandarizar todas las muestras.

La microtomografía computada de alta resolución es un procedimiento de ensayo no destructivo capaz de caracterizar muestras según la morfología y, por medio de análisis, de dar cuenta de las propiedades estructurales.

La determinación de la morfología se establece a partir de las propiedades físicas y espaciales de la absorción/transmisión de radiación de la muestra. Se calcula de la distribución espacial de la densidad electrónica ρ_e , que es proporcional a la densidad másica ρ , por medio de coeficientes de absorción μ_{abs} , obtenido de mediciones de la intensidad de radiación que transmite la muestra ($J(x)$) respecto de la incidente ($J(x=0)$):

$$J(x) = J(x=0) \int_{S(E)} \rho(E) e^{-\int \Delta x \mu_{abs}(E, x) dx} dE$$

donde los parámetros involucrados son el espesor de la muestra Δx y las características espectrales del haz de radiación $S(E)$.

El ensayo se completa con el procedimiento de reconstrucción tomográfica:

$$f(x, y) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\pi \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\partial \hat{f}(\rho, \phi)}{\partial \rho} \frac{d\rho d\phi}{x \cos(\phi) + y \sin(\phi) - \rho}$$

determinando, a partir de proyecciones $\hat{f}(\rho, \phi)$, la distribución espacial de la cantidad $f(x, y)$, obteniendo así la distribución de densidades de la muestra de estudio.

La densidad másica ρ_m se calcula a partir de la densidad electrónica ρ_e , con el coeficiente de atenuación lineal de rayos X μ para la energía E descrito en términos de la sección eficaz de interacción, que en el régimen de operación de la presente técnica de μ CT se debe básicamente a contribuciones coherentes (menores), efecto fotoeléctrico y dispersión incoherente:

$$\mu = \rho_m \frac{N_A}{A}$$

$$\rho_m [\%] = \frac{\rho_e}{\rho_e, ref} [\%] = \frac{\mu}{\mu_{ref}} [\%]$$



Figura 4. Muestra fijada y seccionada para ser analizada.

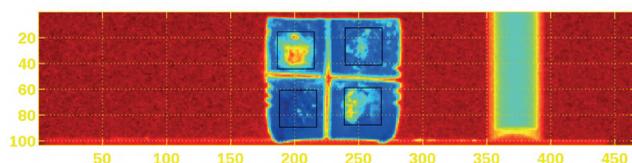


Figura 5. Imagen radiográfica en mapa de colores jet con delimitación de las zonas de análisis.

Es importante recordar que estamos midiendo densidad radiológica, por lo cual, cuando el material de relleno empleado en el defecto sea más radiopaco que el hueso nativo del espécimen, se obtendrá una mineralización mayor al 100% (figs. 6 y 7).

También es preciso tener en cuenta que esta densidad radiológica nos da una idea del material calcificado presente en el defecto generado –sin especificar si se trata de material de relleno no reabsorbido o de hueso nuevo– y del porcentaje de cada uno.

Luego de la reconstrucción tomográfica tridimensional, se procedió a definir la zona de defecto, para una vista frontal, como un área de 29 vóxeles de ancho por 29 vóxeles de alto, por el espesor óseo total de la muestra.

Se decidió una zona cuadrangular ligeramente menor al diámetro del defecto por ser esta forma geométrica de análisis más fácilmente repetible que la forma cilíndrica en la proyección espacial, lo cual implica una menor posibilidad de errores en la repetición del modelo de una a otra de las muestras estudiadas.

En cada uno de los 29 cortes, se definió el área del defecto de 29 vóxeles de largo por el ancho proyec-

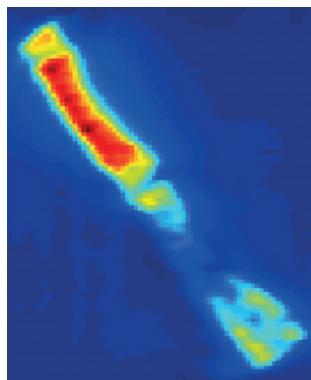


Figura 6. Corte transversal en mapa de colores jet. El azul representa las zonas de menor calcificación, y el rojo, las de mayor calcificación.

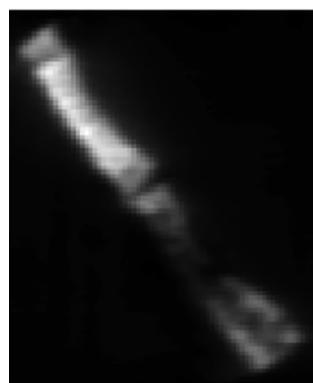


Figura 7. Corte transversal en escala de grises en el que se aprecian claramente las diferentes zonas de calcificación.

tado del espesor óseo, y se midió la densidad radiológica de esa zona con el programa ImageJ 1.48v para Java 1.6.0.20 (Oracle Corp., Redwood Shores, CA, Estados Unidos). También se tomaron 20 mediciones de la densidad radiológica de una zona no intervenida del hueso de la calota próximo al defecto, y 10 mediciones de la densidad radiológica a un patrón estándar (agua desmineralizada), a fin de estandarizar todas las muestras entre sí. El agua destilada no representa un extremo de medición; se utilizó como patrón conocido para estandarizar la totalidad de las muestras, ya que al colocar un divisor conocido bajo cada medición se eliminan todas las variables ambientales.

Una vez obtenidas las 29 medidas de densidades radiológicas en cada muestra, se estableció el promedio y se lo dividió por el promedio del patrón estándar para esa muestra particular. Del mismo modo, el promedio de densidad radiológica para el hueso no intervenido fue dividido por el promedio del patrón estándar para esa muestra específica.

Por último, se definió el valor promedio del hueso no intervenido como 100% de mineralización para ese espécimen, y así se pudo establecer el porcentaje de mineralización de cada muestra (defecto).

Resultados

Los porcentajes de mineralización registrados en ambas etapas (4 y 8 semanas) según el tipo de membrana y relleno del injerto se expresan en la tabla 1.

Con el objeto de evaluar la influencia de los factores (tipo de membrana, material de relleno y tiempo sobre el porcentaje de mineralización registrado en las cavidades y a la posible interacción entre ellos), se realizó un análisis conjunto o multifactorial (ANOVA de tres vías) (tabla 2).

De acuerdo al análisis de las varianzas asociadas a los diversos factores evaluados en este estudio, solo el tipo de material de relleno resultó un factor significativo en cuanto al porcentaje de mineralización ($p < 0,05$), lo cual no fue así para el tipo de membrana ni el tiempo, ni para las interacciones entre los factores ($p > 0,05$).

Los materiales de relleno dentario (96,83%) y Bio-Oss (Geistlich-Pharma AG, Wolhusen, Suiza) (88,42%) registraron los porcentajes de mineralización más elevados, pero sin diferenciarse significativamente entre sí (subconjunto 2). En cambio, MinerOss (BioHorizons, Birmingham, AL, Estados Unidos) arrojó porcentajes de mineralización bajos (76% de media), con valores levemente superiores a los registrados en el grupo de cavidades sin relleno (70,33%), tanto que la diferencia entre estos no fue significativa (subconjunto 1). Cabe aclarar que los materiales del subconjunto 1 se diferenciaron significativamente de los del subconjunto 2 (tablas 3 y 4).

Como puede observarse en la tabla 5 y el gráfico 1, el material que registró valores de mineralización más elevados en ambas etapas –asociado a una mayor efectividad– fue el relleno dentario, seguido por Bio-Oss. Las diferencias entre los materiales son más acentuadas en la primera etapa (4 semanas). A las 8 semanas se aproximan entre sí, pero mantienen el orden de efectividad.

Los mayores porcentajes de mineralización (media) se registraron para las membranas amniocoriónicas (83,63%), seguidas por las de colágeno (81,44%) y, finalmente, por las membranas fascia lata (80,63%); pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), por lo que se agrupó a todas las membranas dentro de un único subconjunto homogéneo (tablas 6 y 7).

En la tabla 8 y el gráfico 2 se expresan los valores medios de mineralización según membrana y etapa, con números semejantes en ambas etapas para cada membrana. Nótese que se verificó una menor dispersión en la etapa tardía (8 semanas), dato que se desprende a partir de los valores de las desviaciones estándar calculadas (DE). Aun así, las diferencias entre etapas no resultaron significativas.

En los gráficos 2 y 3 se observan medias porcentuales muy similares para cada uno de los cuatro materiales de relleno, independientemente del tipo de membrana utilizado. Esto corrobora y complementa gráficamente el resultado obtenido inicialmente respecto a la no interacción entre estos factores.

El gráfico 4 es una representación de los mismos datos pero con otra perspectiva, la cual permite observar mejor las diferencias entre materiales de relleno y las escasas diferencias entre las membranas.

Discusión

En el presente estudio se encontró más material no calcificado en el grupo de control (sin relleno agregado) que en los grupos con relleno. Esto está de acuerdo con Calvo Guirado *et al.*,²⁸ quienes compararon HA-b TCP solo, HA-bTCP con agregado de sílice y defectos vacíos en calotas de conejos y hallaron cantidades significativamente mayores de tejido conectivo en los grupos control que en los grupos con diferentes rellenos.

Tal como sostienen Turri *et al.*,²⁹ desde hace años viene demostrándose –tanto en experimentación como en el ámbito clínico– que la combinación de una membrana de barrera y diversos materiales de sustitución ósea posee una actividad sinérgica que permite lograr la regeneración ósea predecible con un resultado exitoso a largo plazo, en particular en tratamientos de implantes orales.³⁰⁻³⁶

Asimismo, Aloise *et al.*,³⁷ quienes compararon un andamio xenográfico enriquecido con *stem cells* de médula ósea (TG), material osteoconductor xenográfico sin enriquecer (NGC) y hueso autólogo (PCG) con y sin membrana colágena de cobertura en conejos, encontraron que el uso de membrana produciría un efecto sinérgico en la cicatrización ósea en PCG y en NGC, pero no así en TG. Cuando se usaron células pluripotenciales de médula ósea, no hubo diferencias entre los distintos tipos de membranas.

Esto concuerda con Delgado-Ruiz *et al.*, quienes concluyen que la adición de *stem cells* de diferentes orígenes al material de injerto incrementa la formación ósea en el transcurso del período de cicatrización temprana.³⁸

Tabla 1. Porcentajes de mineralización registrados a las 4 y a las 8 semanas, según tipo de membrana y relleno del injerto.

Etapa	Membrana	Relleno				Ref. espécimen
		Sin relleno	MinerOss	Bio-Oss	Dentario	
4 semanas	Fascia lata	57%	73%	83%	99%	900
		70%	76%	93%	103%	877
	Colágeno Mem-Lok	57%	77%	87%	108%	878
		66%	77%	82%	88%	553
	Amniocoriónicas	78%	57%	99%	79%	91
		73%	85%	107%	127%	222
8 semanas	Fascia lata	75%	74%	71%	77%	879
		79%	80%	90%	90%	865
	Colágeno Mem-Lok	75%	85%	93%	100%	889
		71%	68%	76%	93%	866
	Amniocoriónicas	69%	83%	92%	91%	90
		74%	77%	88%	107%	93

Las tonalidades rojas expresan bajos porcentajes de mineralización, y las tonalidades verdes, porcentajes elevados.

Tabla 2. ANOVA multifactorial.

Factores	SC	GL	MC	F	(p-valor)
Material	5161,23	3	1720,41	14,92	0,00
Membrana	339,04	2	169,52	1,47	0,25
Tiempo	11,02	1	11,02	0,096	0,76
Material × membrana	288,96	6	48,16	0,418	0,86
Material × tiempo	492,73	3	164,24	1,424	0,26
Membrana × tiempo	67,79	2	33,89	0,294	0,748
R cuadrado = 0,709 (R cuadrado corregida = 0,431)					

F: estadístico de Fisher; GL: grados de libertad; MC: media cuadrática; (p-valor): significación estadística; SC: suma de cuadrados.

Tabla 3. Test DHS de Tukey, basado en las medias observadas según material de relleno.

Materiales contrastados	Diferencia entre medias	Significación (p-valor)
Sin relleno ↔ MinerOss	-5,67	0,576
Sin relleno ↔ Bio-Oss	-18,08*	0,002
Sin relleno ↔ Dentario	-26,5*	0,000
MinerOss ↔ Bio-Oss	-12,42*	0,043
MinerOss ↔ Dentario	-20,83*	0,000
Bio-Oss ↔ Dentario	-8,42	0,247

(*) La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Tabla 4. Test DHS de Tukey (complementario). Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Material de relleno	n	Subconjunto	
		1	2
Sin relleno	12	70,33	
MinerOss	12	76	
Bio-Oss	12		88,42
Dentario	12		96,83
Significación (p-valor)		0,576	0,247

Tabla 5. Valores estadísticos descriptivos de porcentajes de mineralización. Recuento de casos, media y desviación estándar según material y etapa.

Material de relleno	Tiempo	n	Media	DE
Sin relleno	4 semanas	6	66,83	8,57
	8 semanas	6	73,83	3,49
	Total	12	70,33	7,23
MinerOss	4 semanas	6	74,17	9,3
	8 semanas	6	77,83	6,24
	Total	12	76	7,79
Bio-Oss	4 semanas	6	91,83	9,81
	8 semanas	6	85	9,21
	Total	12	88,42	9,75
Dentario	4 semanas	6	100,67	16,65
	8 semanas	6	93	10,14
	Total	12	96,83	13,74
Total	4 semanas	24	83,38	17,5
	8 semanas	24	82,42	10,37
	Total	48	82,9	14,24

DE: desviación estándar; n: recuento de casos.

Según Martínez *et al.*,³⁹ quienes comparan hueso bovino desproteínizado con fosfato tricálcico en fase beta en calotas de conejos, la acción de la membrana como un potenciador del crecimiento óseo se infiere por el cierre completo del defecto en los sitios de control, a pesar de que hay un colapso parcial de la membrana. Hammerle y Jung³¹ inducen la reparación de la red de hueso en el espacio por debajo de la membrana, y para algunos autores, como Donos *et al.*,³⁴ esta es el elemento principal en la curación del defecto óseo.

En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas entre las distintas membranas

utilizadas. Por el contrario, sí se encontraron diferencias significativas en cuanto al tipo de relleno óseo empleado, por lo que se establecieron dos subgrupos según el grado de calcificación alcanzado: uno, integrado por el relleno dentario particulado y el hueso bovino desproteínizado (Bio-Oss), y el otro, por el hueso humano calcinado (MinerOss) y el relleno por coágulo sanguíneo sin material agregado.

Tras este primer análisis, se comprende que en la cima de los valores de calcificación se encuentre el material dentario particulado, ya que estamos hablando de un material con mayor grado de calcificación inicial que el hueso receptor, y de partículas de muy lenta reabsorción. Por esto mismo, los valores más bajos de mineralización los mostró el coágulo sanguíneo, sobre todo a las 4 semanas de cicatrización, siguiendo, aparentemente, los patrones de cicatrización normal para la especie.¹⁵

Entre los defectos rellenos con hidroxiapatita humana y hueso bovino desproteínizado se apreció una diferencia significativa, lo cual constituyó un hallazgo inesperado, que no puede explicarse mediante la microtomografía computada de alta resolución, sino que habrá que esperar hasta que se realicen los estudios histomorfométricos de segunda etapa.

Es probable, tal como indican Martínez *et al.*,³⁹ que la naturaleza del injerto sustituto juegue un rol relevante en la cantidad de hueso formado.

Asimismo, la reabsorción de los injertos óseos ha sido un problema tanto para investigadores como para clínicos.⁴⁰ Desde hace muchos años, se cree que el origen embrionario de los injertos desempeña un papel importante en su capacidad de reabsorción, y que los injertos de origen membranoso son capaces de resistir mejor la reabsorción que los de origen endocondral.⁴¹ Pero estudios más recientes revelaron que la proporción entre hueso cortical y trabecular pesa más que el origen embrionario del injerto.⁴²⁻⁴⁴

Gráfico 1. Porcentajes de mineralización (media) según material de relleno y etapa.

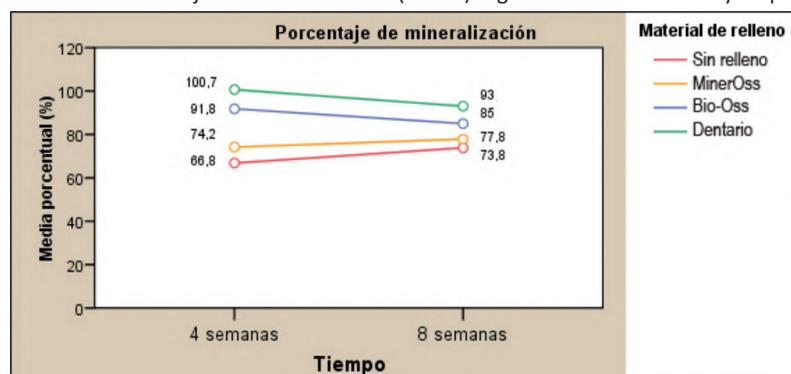


Tabla 6. Test DHS de Tukey. Basado en las medias observadas según membrana.

Membranas contrastadas	Diferencia entre medias	Significación (p-valor)
Fascia lata ↔ Colágeno	-0,81	0,975
Fascia lata ↔ Amniocoriónicas	-6	0,273
Colágeno ↔ Amniocoriónicas	-5,19	0,374

La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

Tabla 7. Test DHS de Tukey (complementario). Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Membrana	n	Subconjunto
		1
Fascia lata	16	80,63
Colágeno	16	81,44
Amniocoriónicas	16	86,63
Significación (p-valor)		0,273

Tabla 8. Valores estadísticos descriptivos de porcentajes de mineralización. Recuento de casos, media y desviación estándar según membrana y etapa.

Membrana	Tiempo	n	Media	DE
Fascia lata	4 semanas	8	81,75	15,76
	8 semanas	8	79,5	7,07
	Total	16	80,63	11,85
Colágeno	4 semanas	8	80,25	15,32
	8 semanas	8	82,63	11,79
	Total	16	81,44	13,27
Amniocoriónicas	4 semanas	8	88,13	21,97
	8 semanas	8	85,13	12,09
	Total	16	86,63	17,2
Total	4 semanas	24	83,38	17,49
	8 semanas	24	82,42	10,37
	Total	48	82,9	14,24

DE: desviación estándar; n: recuento de casos.

Gráfico 2. Porcentajes de mineralización (media) según membrana y tiempo.

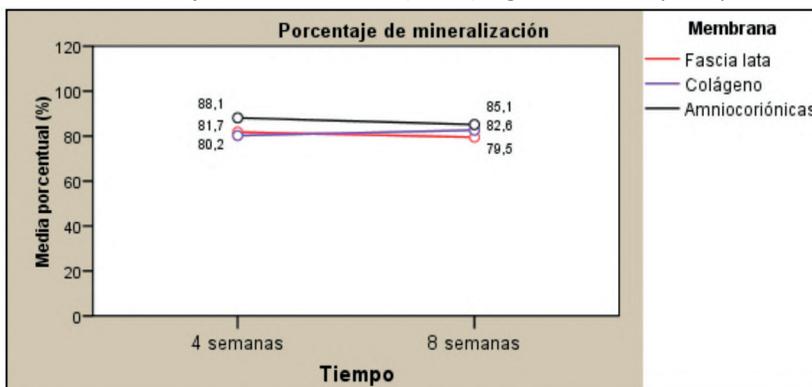


Gráfico 3. Porcentajes de mineralización (media) según material de relleno y membrana.

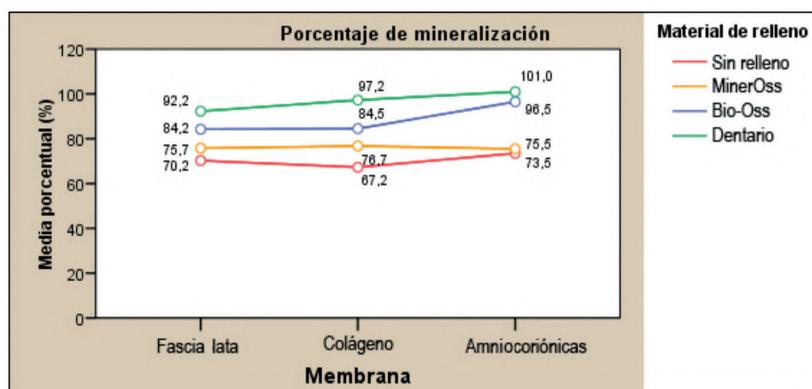
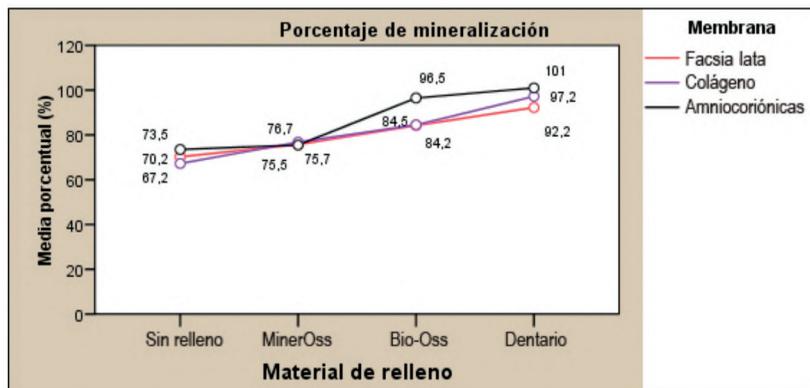


Gráfico 4. Porcentajes de mineralización (media) según membrana y material de relleno.

Resulta interesante recordar que, tal como establecen Delgado Ruiz *et al.*, el grado de compactación del material de injerto tiene una relación directa con su grado de reabsorción. En el presente trabajo, por tratarse de un defecto óseo crítico de espesor total, el grado de compactación fue mínimo, dado que la presión ejercida habría enviado material de injerto al interior del cráneo de los especímenes.⁴⁵

Además, la porosidad y la irregularidad de la superficie de las partículas juegan un rol fundamental en el tiempo de reabsorción del material de injerto.⁴⁶

Conclusiones

En el presente estudio, las tres membranas utilizadas no mostraron diferencias estadísticas entre sí en ninguno de los dos períodos de tiempo.

Sí hubo diferencias estadísticas entre los materiales de relleno utilizados; los defectos tratados con diente particulado y con hueso bovino desproteínizado evidenciaron gran cantidad de material calcificado, mientras que los defectos tratados con hidroxiapatita humana y los que no fueron rellenos registraron menor cantidad.

Agradecimientos: A la Méd. Vet. Cecilia Luciano y su equipo de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA en Paraná. Al Dr. Mauro Valente y su equipo del Laboratorio LIIFAMIR de la Facultad de Astronomía, Matemática y Física de la Universidad Nacional de Córdoba. Al Méd. Vet. Cristian D. Germiniani. A las Dras. Gabriela Cabanillas y Laura Bessone de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación con este estudio y afirman no haber recibido financiamiento externo para realizarlo.

Referencias

1. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005;32:212-8.
2. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res* 1990;5:717-23.
3. Bang G, Urist MR. Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin. *Arch Surg* 1967;94:781-9.
4. Bessho K, Tagawa T, Murata M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. *J Oral Maxillofac Surg* 1990;48:162-9.
5. Butler WT, Mikulski A, Urist MR, Bridges G, Uyeno S. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. *J Dent Res* 1977;56:228-32.
6. Murata M, Kawai T, Kawakami T, Akazawa T, Tazaki J, Ito K, *et al.* Human acid-insoluble dentin with BMP2 accelerates bone induction in subcutaneous and intramuscular tissues. *J Ceram Soc Jpn* 2010;118:438-41.
7. Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol* 1967;12:999-1008.
8. Huggins C, Wiseman S, Reddi AH. Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *J Exp Med* 1970;132:1250-8.
9. Mahdi Kadkhodazadeh, Majid Ghasemianpour, Negar Soltanian, Gholam Reza Soltanian, Shahriar Ahmadvour, Reza Amid. Effects of fresh mineralized dentin and cementum on socket healing: a preliminary study in dogs. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2015;41:119-23.
10. Lorenzoni M, Pertl C, Polansky R, Wegscheider W. Guided bone regeneration with barrier membranes. A clinical and radiographic follow-up study after 24 months. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:16-23.
11. Tatakis DM, Promsudthi A, Wikesjö OM. Devices for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 1999;19:59-73.
12. Hardwick R, Scantlebury TV, Sánchez R, Whitley N, Ambruster J. Membrane design criteria for guided bone

- regeneration of de alveolar ridge. En: Buser D, Dahlin C, Schenk RK (eds.). *Guided bone regeneration in implant dentistry*. Chicago, Quintessence, 1994, pp. 101-36.
13. Boyne PJ. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. *J Am Dent Assoc* 1969;78:767-76.
 14. Khojasteh A, Soheilifar S, Mohajerani H, Nowzari H. The effectiveness of barrier membranes on bone regeneration in localized bony defects. A systematic review. *JOMI* 2013;4:1076-89.
 15. Hämmerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 1995;53:167-74.
 16. Claffey N, Motsinger S, Ambruster J, Egelberg J. Placement a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound healing in dogs. *J Clin Periodontol* 1989;16:12-6.
 17. Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. *Métodos de anestesia y analgesia en roedores y conejos*. 2011;1-10.
 18. Stavropoulos A, Chiantella G, Costa D, Steigmann M, Windisch P, Sculean A. Clinical and histologic evaluation of a granular bovine bone biomaterial used as an adjunct to GTR with a bioresorbable bovine pericardium collagen membrane in the treatment of intrabony defects. *J Periodontol* 2011;82:462-70.
 19. Kothiwale SV, Anuroopa P, Gajiwala AL. A clinical and radiological evaluation of DFDBA with amniotic membrane versus bovine derived xenograft with amniotic membrane in periodontal grade II furcation defects. *Cell and Tissue Banking* 2009;10:317.
 20. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghana-vi J, Seifalian A. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells and Materials* 2008;15:88-99.
 21. Trelford JD, Hanson FW, Anderson DG, Mendel V. Implanted amniotic membrane as an autograft and as an allograft. *J Med* 1975;6:169-80.
 22. Thomaidis V, Kazakos K, Lyras D, Dimitrakopoulos I, Lazaridis N, Karakasis D, et al. Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defects beyond critical size. *Med Sci Monit* 2008;14:67-73.
 23. Tal H, Moses O, Kozlovzky A, Nemcovsky C. Bioresorbable collagen membranes for guided bone regeneration. En: Tal H (ed.). *Bone regeneration*. InTechOpen Publisher, 2012.
 24. Li ST. Dense collagen membrane matrices for medical uses. Patente estadounidense # 5206028 (27/4/1993), US005206028A.
 25. Moses OI, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, et al. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol* 2008;79:905-11.
 26. Rothamel DI, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:369-78.
 27. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2013, partes 1 y 2. *Laboratory Animals* 1996;30:293-316.
 28. Calvo-Guirado JL, Garces M, Delgado-Ruiz RA, Ramírez Fernández MP, Ferres-Amat E, Romanos GE. Biphasic b-TCP mixed with silicon increases bone formation in critical site defects in rabbit calvaria. *Clin Oral Impl Res* 2015;26:891-7.
 29. Turri A, Dahlin C. Comparative maxillary bone-defect healing by calcium-sulphate or deproteinized bovine bone particles and extra cellular membranes in a guided bone regeneration setting: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2015;26:501-6.
 30. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *Journal of Neurosurgery* 1991;74:487-91.
 31. Hammerle CHF, Jung R. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontology* 2000 2003;33:36-53.
 32. Stavropoulos F, Dahlin C, Ruskin JD, Johansson C. A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. An experimental study in a canine model. *Clinical Oral Implants Research* 2004;15:435-42.
 33. Simion M, Dahlin C, Rocchietta I, Stavropoulos A, Sánchez R, Karring T. Vertical ridge augmentation with guided bone regeneration in association with dental implants: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 2007;18:86-94.
 34. Donos N, Mardas N, Chadha V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, spilt osteotomy). *Journal of Clinical Periodontology* 2008;35:173-202.
 35. Espósito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;16:CD003607.
 36. Jung RE, Fenner N, Hammerle CH, Zitzmann NU. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clinical Oral Implants Research* 2013;24:1065-73.
 37. Aloise A, Pelegri A, Zimmermann A, De Mello e Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defect using bone marrow stem cells or autogenous bone with or without collagen membrane. A histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30:208-15.
 38. Delgado-Ruiz R, Calvo Guirado J, Romanos G. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvaria. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Impl Res* 2015;0:1-15.
 39. Martínez A, Balboa O, Gasamans Xose I, Otero-Cepeda L, Guitian F. Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. *Clin Oral Impl Res* 2015;26:623-32.
 40. Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical size defects. *Journal of Clinical Oral Implants Research* 2004;15:101-11.

41. Sbordone C, Toti P, Guidetti F, Califano L, Santoro A, Sbordone L. Volume changes of iliac crest autogenous bone grafts after vertical and horizontal alveolar ridge augmentation of atrophic maxillas and mandibles: a 6-year computerized tomographic follow-up. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2012;70:2559-65.
42. Zins JE, Whitaker LA. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1983;72:778-85.
43. Ozaki W, Buchman S, Goldstein S, Fyhrie D. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1999;104:139-47.
44. Bernstein S, Cooke J, Fotek P, Wang HL. Vertical bone augmentation: where are we now? *Implant Dentistry* 2006;15:219-28.
45. Delgado-Ruiz R, Romanos G, Alexandre S, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez de Val J, Calvo-Guirado J. Biological effects of compressive forces exerted on particulate bone grafts during socket preservation: animal study. *Clin Oral Impl Res* 2016;0:1-10.
46. Tovar N, Jimbo R, Marin C, Witek L, Suzuki M, Bonfante EA, *et al.* Bone regeneration around implants placed in fresh extraction sockets covered with a dual-layer PTFE/collagen membrane: an experimental study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2014;34:849-55.

Contacto:

ENRIQUE FERNÁNDEZ BODEREAU
bodereau@uolsinectis.com.ar
Crisol 193, 2° "D"
(X5000BVC) Córdoba, Argentina