



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Efecto de la matriz de beta-fosfato tricálcico con fibronectina en la reparación de defectos óseos críticos: estudio experimental del potencial de regeneración ósea y su aplicabilidad clínica

Jaume Escoda Francolí

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Departament d'Odontoestomatologia  
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut  
Universitat de Barcelona**

**EFFECTO DE LA MATRIZ DE BETA-FOSFATO TRICÁLCICO CON  
FIBRONECTINA EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS  
CRÍTICOS: ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL POTENCIAL DE  
REGENERACIÓN ÓSEA Y SU APLICABILIDAD CLÍNICA**

**Memoria de investigación para obtener el grado de Doctor en Odontología**

**Presentada por**

**Jaume Escoda Francolí**

**Barcelona, 2019**



**Tesis Doctoral dirigida por:**

**Profa. Dra. María Ángeles Sánchez-Garcés**

**Profesora Agregada de Cirugía Bucal, Profesora del Máster de Cirugía Bucal e Implantología Bucofacial, Facultat de Medicina y Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Barcelona. Investigadora del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL),**



La Profa. Dra. María Ángeles Sánchez-Garcés, como directora y tutora de la Tesis doctoral elaborada por Jaume Escoda Francolí, Licenciado en Odontología, con el título “Efecto de la matriz de beta-fosfato tricálcico con fibronectina en la reparación de defectos óseos críticos: Estudio experimental del potencial de regeneración ósea y su aplicabilidad clínica”, inscrita en el Departament d’Odontoestomatologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona

**HACE CONSTAR**

Que el trabajo reúne todos los requisitos necesarios para entrar en depósito y las condiciones para ser defendido ante el tribunal correspondiente a efectos de optar al grado de Doctor en Odontología

**Y PARA QUE ASÍ CONSTE, FIRMO ESTE DOCUMENTO**

Profa. Dra. María Ángeles Sánchez-Garcés

Barcelona, octubre de 2018



## DEDICATORIA

A mis padres, por estar siempre allí

A mi prometida, Carolina, junto a ella cada día es mejor

A mis amigos y conocidos por ayudarme cuando os he necesitado





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco infinitamente a la Profa. Dra. María Ángeles Sánchez-Garcés, Profesora Agregada de Cirugía Bucal y del Máster de Cirugía Bucal e Implantología Bucofacial de la Facultat de Medicina y Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona, su labor como Directora de esta Tesis doctoral y su apoyo incondicional, sin su ayuda, este trabajo no hubiera sido posible. Su vocación, dedicación y trabajo constante y altruista son para mí un ejemplo a seguir a lo largo de mi carrera profesional presente y futura.

A los Profs. Dres. Rui Barbosa Figueiredo, Eduard Valmaseda Castellón y Cosme Gay Escoda, mi agradecimiento más sincero por su constante paciencia, ayuda, colaboración, ánimo y empuje en el desarrollo de este trabajo.

El trabajo de los coautores del artículo, Dres. Álvaro Gimeno-Sandig, Fernando Muñoz-Guzón, Joan R. Barbany-Cairó y Llorenç Badiella-Busquets, además de la Dra. María Ángeles Sánchez-Garcés y del Dr. Cosme Gay Escosa, ha sido indispensable para lograr la meta de la publicación del artículo en una prestigiosa revista del Q1 como es *Clinical Oral Implants Research*.

A todas aquellas personas que siempre han confiado en mí y me han animado a esforzarme y mejorar, descubriendo que con trabajo y entusiasmo uno crece como persona y como profesional.

A mis padres, por su constante empuje y ayuda sin límites.

A mi pareja y prometida, por su paciencia y amor.

A mis amigos, por compartir conmigo estos momentos a lo largo del camino y por los que nos podrá deparar el futuro.

A la Dra. Marta Pulido, por su ayuda en la redacción y presentación del manuscrito.

## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**



## CONTENIDOS

Capítulo 1. Introducción y fundamento.....	17
1.1 Tejido óseo y remodelación ósea.....	19
1.2 Regeneración ósea guiada.....	23
1.2.1 Características de las membranas.....	24
1.2.1.1 Membranas reabsorbibles.....	25
1.2.1.2 Membranas no reabsorbibles.....	26
1.2.2 Injertos óseos y matrices óseas.....	27
1.2.3 Materiales aloplásticos: el beta-fosfato tricálcico.....	29
1.2.4 Proteínas adhesivas: la fibronectina.....	33
1.3 Modelos de regeneración ósea guiada y defectos de tamaño crítico.....	35
Capítulo 2. Motivo y justificación.....	37
Capítulo 3. Hipótesis y objetivos.....	41
3.1 Hipótesis.....	43
3.2 Objetivos.....	43
Capítulo 4. Material y método.....	45
4.1 Material.....	47
4.2 Diseño del estudio.....	47
4.3 Protocolo quirúrgico.....	48
4.4 Obtención de las muestras y preparación histológica.....	57
4.5 Análisis histomorfométrico.....	58
4.6 Análisis estadístico.....	60
Capítulo 5. Resultados.....	61
5.1 Área aumentada.....	64
5.2. Matriz ósea mineralizada.....	65
5.3 Sustituto óseo.....	67
5.4 Tejido ganado.....	68
Capítulo 6. Discusión.....	79
Capítulo 7. Conclusiones.....	89
Capítulo 8. Bibliografía.....	93
Capítulo 9. Anexos.....	109



## ABREVIATURAS

AA: área aumentada.

ADSCs: Las células madre autólogas de origen tejido adiposo (*adipose-derived stem cells*).

ARRIVE: *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*.

ASBMR: *American Society for Bone and Mineral Research*.

$\beta$ -TCP: beta-fosfato tricálcico.

$\beta$ -TCP-Fn: beta-fosfato tricálcico con fibronectina.

BMP: proteínas morfogenéticas del hueso (*bone morphogenetic proteins*).

BMP-2: proteína morfogenética ósea 2 (*bone morphogenetic protein 2*).

BRU: unidad de remodelación ósea (*bone remodeling unit*).

BS: sustituto óseo (*bone substitute*).

CEEA: Comité de Ética de Experimentación Animal.

CMM: células madre mesenquimatosas.

CT: tomografía computadorizada.

DE: desviación estándar.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

DPBS: solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*).

EGCG: epigallocatequina-3-galato.

FGF-2: factor de crecimiento de fibroblastos 2 (*fibroblast growth factor 2*).

Fn: fibronectina.

GT: tejido ganado (*gained tissue*).

h: horas.

HA: hidroxiapatita.

HDPE: polietileno de alta densidad (*high-density polyethylene*).

MAR: tasa de aposición mineral (*mineral apposition rate*).

MBM: matriz ósea mineralizada (*mineralized bone matrix*).

MOBD: matriz ósea bovina desproteinizada.

MOD: matriz ósea desmineralizada.

NMT: tejido no mineralizado (*non-mineralized tissue*).

OPG: osteoprotegerina.

PMO: proteínas morfogenéticas óseas.

PTFE: politetrafluoroetileno.



PTH: hormona paratiroidea (*parathyroid hormone*).

ROG: regeneración ósea guiada.

SAFF: sistema autólogo de fibrinógeno/fibronectina.

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*).

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*).

## **Capítulo 1. INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTO**



## 1.1 Tejido óseo y remodelación ósea

La estructura ósea consiste en el hueso cortical o corteza externa de tejido compacto y el hueso trabecular o tejido de aspecto esponjoso, formado por un entramado de espículas y trabéculas orientadas paralelamente a las líneas de fuerza. El hueso cortical predomina en los huesos largos de las extremidades (diáfisis) y el trabecular, en el esqueleto axial (vértebras, pelvis) y en el extremo de los huesos largos. En el esqueleto adulto, el hueso compacto representa el 80% de la cantidad total de hueso, y el esponjoso, el 20% restante.

El hueso está constituido por un tipo especializado de tejido conectivo consistente en una matriz mineralizada y tres tipos celulares: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos son células de estirpe mesenquimatosa, por lo que tienen un origen común con los adipocitos, los miocitos y los fibroblastos (Florencio-Silva et al., 2015). Los osteoblastos pueden encontrarse en situación de reposo o en actividad (para formar hueso). Tras formar hueso a su alrededor, los osteoblastos quedan enterrados en el seno del mismo, para transformarse en osteocitos (Matsuo & Irie, 2008). Los osteocitos están capacitados para detectar la carga mecánica y las microlesiones de la matriz. Los osteoclastos son células multinucleadas destructoras de hueso y desarrollan su actividad en la superficie ósea. Su efecto resorptivo se debe a la producción de hidrogeniones y enzimas proteolíticas, como la catépsina K. Derivan de un precursor común con el de las células monocítico-macrofágicas (Aarden et al., 1994).

La matriz ósea posee componentes orgánicos e inorgánicos. Las fibras de colágeno tipo I constituyen el 95% de la matriz orgánica. El resto corresponde a material amorfo del que

forman parte diversas proteínas no colagénicas. En condiciones normales, el 99% de la matriz ósea presenta depósitos de fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxapatita y de depósitos amorfos. El 1% restante no presenta depósitos de sales minerales y recibe el nombre de osteoide o matriz no mineralizada. En el hueso cortical, las láminas óseas adoptan una morfología cilíndrica y se disponen concéntricamente unas dentro de otras (sistemas de Havers) (Capulli et al., 2014). En el hueso trabecular, las láminas presentan una morfología entre plana y semilunar, disponiéndose paralelamente en paquetes equivalentes a sistemas de Havers abiertos. Ambos sistemas laminares forman las unidades estructurales óseas.

El hueso está sometido a continuas transformaciones del tipo de modelación y remodelación óseas. La modelación se refiere al conjunto de modificaciones que experimenta el hueso durante su crecimiento para mantener sus características morfológicas (Martin & Seeman, 2008). La modelación ósea incluye fenómenos de resorción subperióstica a medida que la zona metafisaria se transforma en diáfisis, y fenómenos de resorción en la superficie endóstica de la diáfisis para permitir el crecimiento de la cavidad medular. La diáfisis también experimenta fenómenos de aposición subperióstica en la superficie externa, lo que permite su crecimiento en anchura.

La remodelación constituye el proceso en virtud del cual el hueso se renueva continuamente, a fin de evitar la acumulación de lesiones de fatiga y permitir su adaptación a las necesidades mecánicas de cada momento. La remodelación ósea se lleva a cabo mediante la acción sucesiva de osteoclastos y osteoblastos en un punto

concreto de la superficie trabecular, cortical o de los canales de Havers. El hueso recién formado se deposita por capas, inicialmente sin mineralizar (osteóide). La mineralización acontece durante el tiempo de maduración de unos 10 días de promedio o tiempo de desfase de la mineralización (*mineralization lag-time*) (Melsen & Mosekilde, 1980). La zona de transición entre el hueso mineralizado y el que no lo está constituye el frente de mineralización, que presenta la propiedad de su apetencia por las tetraciclinas. El grosor del hueso sin mineralizar es directamente proporcional a la velocidad de formación de la matriz orgánica e inversamente proporcional a la velocidad de avance del frente de mineralización (*mineralization appositional rate*) (Schilling et al., 1992). La coordinación temporal y espacial entre los osteoclastos y los osteoblastos, gracias a la cual los osteoblastos actúan a continuación de los osteoclastos y en el mismo lugar en que estos lo hicieron previamente, se denomina acoplamiento. Durante cada ciclo de remodelación, los osteoclastos y osteoblastos actúan de forma coordinada formando una unidad de remodelación ósea (*bone remodeling unit, BRU*). Se denomina balance óseo a la diferencia entre el volumen de hueso formado y el resorbido en cada BRU. Si se forma menos hueso del que se destruye, el balance óseo resultante será negativo, lo que determina pérdida de masa ósea (Schilling et al., 1992).

En la regulación de la remodelación ósea intervienen un elevado número de factores, tanto locales como generales. Cuando una unidad de tejido óseo debe ser renovada, los osteocitos detectan dicha necesidad y envían diversas señales a la superficie ósea. Se cree que el factor de crecimiento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor, VEGF*) atrae capilares y con ellos, precursores de los osteoclastos. El ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  (*receptor activator for nuclear factor  $\kappa$  b ligand, RANKL*)

también estimula precursores para que maduren los osteoclastos y lleven a cabo su función (Boyce & Xing, 2008). Una vez destruida la cantidad adecuada de tejido óseo, los osteoclastos son inhibidos por varios factores, incluyendo la osteoprotegerina (OPG) y el factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ). Una vez finalizada la resorción ósea, comienza la formación de hueso nuevo a través de la actividad osteoformadora de los osteoblastos. Una vez iniciada la actividad osteoblástica, en la que intervienen las efrinas y sus receptores (proteínas de membrana), dicha actividad es mantenida por factores locales, entre los que destacan las proteínas *Wnt* y las proteínas morfogenéticas del hueso (*bone morphogenetic proteins*, BMP) (Bellido, 2014). Cuando los osteoblastos han formado la cantidad de hueso prevista, reciben señales inhibitorias, principalmente a través de la esclerostina que inhibe la actuación de las proteínas *Wnt*, con lo que finaliza el proceso de formación ósea.

Al margen de las sustancias referidas, en gran medida producidas por las propias células óseas, existen factores locales reguladores de la remodelación producidos por otras células del microambiente óseo (Alford et al., 2015), tales como las citocinas inflamatorias (Bozek & Zaiss, 2017), los linfocitos T, y otros factores generales de carácter hormonal, destacando la hormona paratiroidea (*parathyroid hormone*, PTH), la vitamina D y la calcitonina (Lombardi et al., 2011), así como los estrógenos y los glucocorticoides. Otros factores genéticos, mecánicos y nutricionales también intervienen en el proceso de remodelación ósea (Reyes García et al., 2008).

En el campo de la Implantología, el anclaje de los implantes depende no solo de los factores que afectan a la interfase hueso-implante, sino también en gran medida de la

masa y microestructura del hueso peri-implantario, regulado continuamente por los procesos de remodelación ósea (Li et al., 2018). De hecho, el proceso de remodelación que comienza a las 6 semanas de vida intrauterina y se perpetúa durante toda la vida del individuo, constituye la base biológica responsable de que el tejido óseo pueda regenerarse con tejido idéntico al original, lo que constituye el fundamento de la osteointegración del implante (Sela et al., 2000; Marco et al., 2005; Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, et al., 2006).

## **1.2 Regeneración ósea guiada**

La regeneración ósea guiada (ROG) es una técnica de facilitación de la formación de hueso nuevo en áreas donde existen defectos o deficiencias. Se basa en el uso de barreras o membranas físicas para evitar que las células del epitelio gingival y del tejido conjuntivo invadan las zonas que van a ser regeneradas, favoreciendo la proliferación de las células osteoprogenitoras. El concepto de ROG implica el uso de diferentes materiales y métodos para crear hueso sano y suficiente en los procesos alveolares de los maxilares para cubrir defectos óseos periodontales o para tener procesos alveolares adecuados en donde colocar prótesis dentales convencionales o implantes dentales osteointegrados.

En la década de los 80, el grupo de Nyman et al. (1982, 1987) publicó los primeros estudios experimentales referidos a la regeneración tisular guiada que fueron la base para el desarrollo de los principios de la ROG propuestos por Dahlin et al. en 1988. Todos los procedimientos de ROG se rigen por cuatro principios básicos: el sangrado, la creación y mantenimiento del espacio a regenerar, la inmovilidad de los materiales de regeneración y la estabilidad de la membrana como barrera (Retzepi & Donos, 2010; Fu & Wang, 2011). Dahlin et al. (1988) ya establecieron los cinco requerimientos necesarios



para que la ROG tenga éxito: 1) presencia de células osteogénicas en vecindad con el defecto óseo, 2) adecuada vascularización procedente de la superficie ósea adyacente, 3) estabilidad mecánica de la zona herida durante el periodo de cicatrización, 4) mantenimiento del espacio entre la membrana y el tejido óseo remanente, y 5) la membrana debe ser capaz de excluir células del tejido conectivo o de tejidos blandos del espacio creado por la membrana.

### **1.2.1 Características de las membranas**

Las membranas que se usan en los procedimientos de ROG deben ser biocompatibles, tener las características necesarias para el mantenimiento seguro del espacio a regenerar, actuar como mecanismo de barrera celular, tener una buena integración tisular y ser de fácil manejo clínico (Dimitriou et al. 2012). Respecto a la porosidad de la membrana, los estudios publicados en la literatura no son concluyentes. El tamaño del poro puede influir en las fases iniciales de la regeneración, incrementando la tasa osteogénica de formación ósea temprana, aunque no la cantidad final de hueso formado (Zellin & Linde, 1996; Lundgren et al., 1998). Sin embargo, todavía no se ha establecido un tamaño crítico del poro asociado con una regeneración ósea óptima (Gutta et al., 2009).

Las membranas se clasifican en dos tipos: reabsorbibles y no reabsorbibles (Rakhmatia et al., 2013). Para seleccionar la membrana más adecuada hay que tener en cuenta las características del defecto a regenerar, así como las propiedades físicas y biológicas de cada membrana. Respecto a las membranas reabsorbibles, su principal ventaja es que se degradan con el tiempo, lo que hace innecesaria su retirada en un segundo acto quirúrgico y contribuye a disminuir la morbilidad del tratamiento.

### 1.2.1.1 Membranas reabsorbibles

Las membranas o barreras reabsorbibles están hechas de polímeros naturales (por ejemplo: colágeno porcino o bovino) o polímeros sintéticos (por ejemplo: poliésteres alifáticos como el ácido poliglicólico o la polilactida). La principal limitación de las membranas de colágeno es su rápida biodegradación por la actividad enzimática de las collagenasas procedentes de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Rothamel et al., 2005). Dicha biodegradación impide su completa resistencia y facilita el colapso del espacio del defecto en mayor o menor grado (Rothamel et al., 2005; Matsumoto & Hoshino, 2012). Para limitar la reabsorción y mejorar las propiedades, las membranas de colágeno se someten a un proceso de *cross-linking*, por el cual se tratan con diferentes productos químicos (formaldehído, glutaraldehído, azúcares) o luz ultravioleta para aumentar el número de cruces de las cadenas que componen el colágeno nativo. Una desventaja de las barreras de polímeros naturales es su variabilidad y la falta de control sobre la tasa de reabsorción de la membrana que puede verse influenciada por el pH local, la temperatura, la naturaleza del polímero y su grado de cristalización, así como el volumen de la membrana (Kostopoulus & Karring, 1994; Moses et al., 2008). Por otra parte, las sustancias químicas usadas en el *cross-linking* pueden tener efectos citotóxicos sobre los tejidos circundantes ocasionando la formación de un espacio entre la membrana y el tejido conectivo, lo que facilita la acumulación microbiana (Alpar et al., 2000). En cuanto a las membranas reabsorbibles sintéticas fueron introducidas al final de la década de los 80, y están compuestas básicamente por ácido poliglicólico y ácido poliláctico. Son menos utilizadas que las membranas de colágeno y se presentan en diferentes formas y estructuras. El tiempo de reabsorción suele ser de 6 a 12 semanas. Se

pueden utilizar solas o combinadas con injertos óseos para asegurar el mantenimiento del espacio.

#### **1.2.1.2 Membranas no reabsorbibles**

Las membranas no reabsorbibles están formadas generalmente por politetrafluoroetileno (PTFE) o mallas de titanio. Se caracterizan por ser biocompatibles, capaces de mantener el espacio debajo de la membrana de forma más estable que las membranas reabsorbibles, menor riesgo de complicaciones a largo plazo y su fácil manejo clínico (de Macedo et al., 2008; Zhang et al., 2010). Sin embargo, presentan el inconveniente de la necesidad de realizar una segunda intervención quirúrgica para su retirada, lo que aumenta la morbilidad potencial del proceso.

Existen dos tipos de membranas de PTFE según su estructura: expandido (e-PTFE) y de alta densidad (d-PTFE). El principal exponente de las membranas de e-PTFE son las de Gore-Tex® (WL Gore & Associates, Flagstaff, AZ, EE.UU.), actualmente no disponibles para uso odontológico sino para otros campos médicos como el digestivo o el cardiovascular. Su principal desventaja es el elevado porcentaje de exposiciones a la cavidad bucal, produciendo un mayor riesgo de infección de la zona a regenerar, comprometiendo la cantidad de hueso regenerado (Fotek et al., 2009). Por otra parte, las membranas d-PTFE o nanoporosas ofrecen gran estanqueidad debido a su alta densidad y a sus poros de tamaño reducido, protegiendo así el injerto subyacente de la infiltración bacteriana en caso de fenestración mucosa al no contaminarse su cara interna si se expone al medio bucal, reduciendo por lo tanto el riesgo de infecciones (Bartee, 1995). En el momento actual, las membranas Cytoplast™ (Regentex GBR-200 o TXT-200; Osteogenics Biomedical

Inc., Lubbock, Texas, E.E.U.U.) son para uso odontológico y al no poseer superficie microporosa evitan su adherencia a los tejidos blandos, siendo más fácil su retirada después de la cicatrización de la herida.

El titanio es un metal altamente biocompatible gracias a un fenómeno de pasivación, consistente en la formación de una película de óxido relativamente inerte sobre la superficie que lo protege de la acción de agentes externos, principalmente de los fenómenos de corrosión. Las membranas no reabsorbibles de titanio son una buena alternativa en los procedimientos de ROG debido a sus propiedades mecánicas, pues su rigidez permite cumplir el requisito fundamental como mantenedoras de espacio y evitar el colapso del espacio a regenerar, su elasticidad evita la compresión de la mucosa durante la cicatrización, su estabilidad evita el desplazamiento del injerto colocado debajo de la malla y su plasticidad permite su adaptación al defecto de forma eficiente (Wang & Fenton, 1996; Degidi et al., 2003). No obstante, su rigidez junto con sus bordes afilados, son inconvenientes de este tipo de membranas que incrementan el índice de exposiciones por perforación de la mucosa; a pesar de ello, el riesgo de infecciones es relativamente bajo, a diferencia de las membranas de e-PTFE (von Arx et al., 2001). Otro inconveniente de estas membranas es su adherencia a los tejidos mucosos y óseo debido a su elevado grado de porosidad, lo que a pesar de actuar de forma eficiente limitando el paso de células epiteliales al interior de la zona a regenerar, dificulta su retirada en la segunda intervención quirúrgica.

### **1.2.2 Injertos óseos y matrices óseas**

Los injertos óseos se vienen empleando desde hace décadas para reponer la pérdida de hueso debida a traumatismos, cirugía oncológica, cirugía preprotésica, etc. así como en el

tratamiento de defectos óseos por alteraciones en el desarrollo del esqueleto o tras la extirpación de quistes y tumores óseos (Haddad et al., 2006; Clokie et al., 2002; Beltrán et al., 2014). En Implantología, aunque la reconstrucción protésica sobre implantes osteointegrados proporciona excelentes resultados, en algunas ocasiones, la cantidad de hueso alveolar es insuficiente, lo que impide la colocación de los implantes. En estos casos, los injertos óseos constituyen una de las técnicas más utilizadas en la cirugía reconstructiva, siendo el hueso autólogo el material de elección y el considerado “gold standard” o patrón de comparación respecto a otros materiales de regeneración ósea (Haddad et al., 2006).

En 1965, Urist descubrió cierto potencial osteoinductivo en el hueso desmineralizado (matriz ósea desmineralizada, MOD) aun habiéndolo insertado heterotópicamente en el tejido muscular o en el tejido subcutáneo en animales de experimentación (Urist, 1965). Debido a este descubrimiento, Urist acuñó el término de “proteínas morfogenéticas óseas” (PMO) que correspondía a las proteínas a las que atribuyó esta capacidad regenerativa. Existe evidencia de que el uso de MOD proporciona relleno óseo adecuado en defectos críticos (Borrasca et al., 2015; Huber et al., 2017); y por este motivo, los aloinjertos se consideran una alternativa al hueso autólogo, a pesar de no tener las mismas propiedades regenerativas ni de seguridad.

Otro sustituto óseo alternativo común es el xenoinjerto de origen bovino (o de otras especies animales), cuya utilidad clínica ha sido demostrada en diferentes estudios (Tortolini & Rubio, 2012). La matriz ósea bovina desproteïnizada (MOBD) contiene apatita carbonatada con el mismo componente mineral que el hueso humano. Este material se

ha usado en Odontología, Cirugía Bucal, Traumatología y Cirugía Maxilofacial como injerto óseo, así como en la regeneración periodontal, debido a su reabsorción lenta y a su estructura trabecular, que facilita la entrada en su interior de células sanguíneas y promotoras óseas, de forma que la deposición ósea se ve acelerada. Por lo tanto, es un material con muy buenas características como matriz arquitectónica y además posee una excelente biocompatibilidad. Estudios clínicos efectuados en la última década han demostrado la eficacia de la MOBD para regenerar defectos óseos intraorales, sin embargo, la proliferación y diferenciación osteoblástica parece ser menor para la MOBD frente al hueso autólogo injertado (Huh et al., 2015).

### **1.2.3 Materiales aloplásticos: el beta-fosfato tricálcico**

Los materiales alternativos a los de origen óseo deben presentar las siguientes propiedades: ser osteoconductivos (promocionando el andamiaje celular), biocompatibles, biodegradables, estructuralmente similares al tejido óseo, fáciles de manipular y de coste económico aceptable. Los injertos aloplásticos, obtenidos a partir de materiales inertes, se describen como materiales de injerto sintéticos y presentan dichas características. La hidroxiapatita (HA)  $--Ca_5(PO_4)_3(OH)--$  y el beta-fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP, de las siglas en inglés  *$\beta$ -tricalcium phosphate*)  $--\beta-Ca_3(PO_4)_2--$  son los materiales aloplásticos más comúnmente utilizados en base a su excelente biocompatibilidad y capacidad osteoconductiva (Cai et al., 2009; Bellucci et al., 2016; Rh Owen et al., 2017). Una vez injertado, el  $\beta$ -TCP acabará siendo totalmente remplazado por hueso nuevo a una velocidad de entre 3 y 12 veces más rápido que la HA (Calvo-Guirado et al., 2012). No obstante, aunque el  $\beta$ -TCP tiene una estructura química muy similar a la HA del hueso humano, en ocasiones puede presentar ciertas desventajas, como una reabsorción

demasiado rápida para las dimensiones del defecto a tratar, dificultades de adaptación en la zona del defecto o inadecuada resistencia a la compresión, lo que dificulta su osteointegración. El método más usado para sintetizar el  $\beta$ -TCP es la precipitación química, debido al bajo coste de producción y porque ofrece un mejor control de las partículas resultantes en cuanto a composición, microestructura y propiedades físicas (Lee et al., 2016b). Por otra parte, la HA proveniente de distintos orígenes es una matriz ósea cerámica difícil de moldear con una reabsorción demasiado lenta para que sea reemplazada adecuadamente por hueso nuevo (Suenaga et al., 2015).

La capacidad del  $\beta$ -TCP como biomaterial en la regeneración de defectos óseos ha sido investigada en numerosos estudios experimentales y en clínica odontológica (Muñoz Corcuera, 2012; Wang et al., 2013), tanto aplicado como injerto único o combinado con otros materiales. En diferentes modelos animales, el relleno con  $\beta$ -TCP de defectos óseos creados con fresas de trefina ha demostrado diferencias significativas frente a los defectos vacíos (control) en los parámetros histológicos e histomorfométricos de grosor y anchura trabecular, formación de hueso nuevo y micro-arquitectura ósea (Jensen et al., 2006; Damlar et al., 2015). La utilidad y ventajas del  $\beta$ -TCP como sustituto de los injertos óseos también han sido puestas de manifiesto en revisiones sistemáticas de la literatura (Barber et al., 2017; Liang et al., 2018).

Para promover una regeneración ósea más eficiente y mejorar la calidad, diferentes estudios han utilizado el  $\beta$ -TCP combinado con otros agentes bioactivos. En defectos críticos del cráneo de la rata, Rodríguez et al. (2011) investigaron el efecto de la combinación de  $\alpha$ -TCP con 0,1, 0,2 y 0,4 mg de epigallocatequina-3-galato (EGCG), la

catequina más abundante del té verde. A las 2 y 4 semanas, la formación de hueso nuevo era significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en los grupos de 0,1 y 0,2 mg de EGCG y  $\alpha$ -TCP que en los grupos control (defectos no tratados). La tasa de aposición mineral (*mineral apposition rate*, MAR) también fue significativamente superior para la combinación 0,2 mg EGCG y  $\alpha$ -TCP.

La simvastatina es un fármaco hipocolesterolémico que aplicado tópicamente ha demostrado estimular la proteína morfogenética ósea 2 (*bone morphogenetic protein 2*, BMP-2) y la expresión del VEGF mRNA de los osteoblastos. El tratamiento combinado de  $\beta$ -TCP, HA y simvastatina para promover el crecimiento óseo en la calota craneal de rata, también demostró la osteoconductividad de estos materiales, actuando como mantenedores de espacio para favorecer la formación de tejido óseo y el efecto de estimulación de la regeneración ósea de la simvastatina (Rojbani et al., 2011). En otro estudio, se estableció la dosis de 0.1 mg de simvastatina como la dosis óptima para la estimulación máxima de regeneración ósea (Nyan et al., 2009).

Algunos autores han descrito resultados prometedores en la ROG tras el curetaje de tumores óseos benignos y relleno de la cavidad con  $\beta$ -TCP combinado con aspirado de médula ósea (Damron et al., 2013). En defectos por dehiscencia de implantes en un modelo canino, la combinación con injertos de hueso autólogo particulado también han demostrado su aplicabilidad para la regeneración de la cresta alveolar (Lee et al., 2016a). Otros estudios en cultivos celulares *in vitro* han investigado la biocompatibilidad y capacidad de estimulación de la proliferación de osteoblastos y fibroblastos del  $\beta$ -TCP combinado con polietileno de alta densidad (*high-density polyethylene*, HDPE) con



resultados prometedores (Homaeigohar et al., 2005, 2008), pero estas observaciones no han tenido traducción clínica.

También se ha propuesto la suplementación con factores de crecimiento, incluyendo BMP-2 y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (*fibroblast growth factor 2*, FGF-2) al  $\beta$ -TCP para el tratamiento de defectos óseos. La BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) ha demostrado su capacidad osteoinductiva como biomaterial para estimular la regeneración del tejido óseo (Li et al., 2011). Sin embargo, en un estudio experimental de defectos óseos del cráneo de la rata, la regeneración ósea no fue superior con la combinación de 5  $\mu$ g de BMP-2 y  $\beta$ -TCP frente a los defectos tratados únicamente con  $\beta$ -TCP (Luvizuto et al., 2011). En un estudio multicéntrico doble ciego efectuado en sujetos adultos con defectos infraóseos periodontales tratados con una matriz de  $\beta$ -TCP combinada con 0,3% y 0,4% FGF-2 recombinante humano, la combinación de  $\beta$ -TCP y rh-FGF-2 fue superior al grupo  $\beta$ -TCP en el crecimiento lineal de hueso evaluado radiológicamente y a los 6 meses (Cochran et al., 2016).

Las poblaciones celulares ideales usadas en procedimientos de ingeniería tisular basada en matrices de soporte son las células madre indiferenciadas, que pueden ser aisladas de fuentes óseas adultas. Las células madre mesenquimáticas (CMM) adultas se obtienen normalmente de la médula ósea y son capaces de inducir la neoformación ósea *in vivo* en defectos críticos. Otras fuentes de CMM prometedoras incluyen la pulpa dentaria y el periostio, capaces de diferenciarse en múltiples tipos celulares incluyendo los osteocitos y otras células que con matrices apropiadas pueden regenerar diferentes tipos de tejidos bucales (Annibali et al., 2013, 2014). También se ha estudiado el efecto de las células

madre autólogas de origen en tejido adiposo (*adipose-derived stem cells*, ADSCs) con  $\beta$ -TCP (con y sin fibronectina) como recubrimiento en procedimientos regenerativos de defectos críticos de la cortical vestibular mandibular en perros Beagle. El uso de  $\beta$ -TCP con ADSCs y fibronectina no parecía incrementar el porcentaje de tejido óseo neoformado, ni la aposición ósea en la superficie de implantes, aunque mantenía el espacio regenerado de forma más eficiente a los 3 meses de cicatrización con respecto a los grupos de  $\beta$ -TCP solo,  $\beta$ -TCP con fibronectina y control (Alvira-González et al., 2016). En otro estudio en el mismo modelo canino, el uso de ADSCs en los procesos de regeneración ósea de defectos de tipo dehiscencia asociados con la colocación simultánea de implantes no aumentaba el área de regeneración ni el porcentaje de la superficie de contacto hueso-implante (Sánchez-Garcés et al., 2017).

#### **1.2.4 Proteínas adhesivas: la fibronectina**

La fibronectina (Fn) es una glucoproteína presente en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos. Las moléculas de Fn se organizan en fibrillas en la superficie celular, asociadas con integrinas determinando un ensamblaje del citoesqueleto de actina. La Fn interviene activamente en los fenómenos de adhesión celular. Asimismo, participa en la migración, proliferación, expansión y la diferenciación celular. Al igual que en el caso de otras proteínas de adhesión como la vitronectina y la osteopontina, se ha estudiado si la combinación de Fn con diversos biomateriales podía incrementar el potencial de regeneración ósea. La inducción de la diferenciación osteoblástica producida por la Fn parece que tiene lugar a través de una vía de señalización mediada por BMP-2 (Cho et al., 2017).

En cultivos celulares de matrices de  $\beta$ -TCP, el uso combinado de la enzima transglutaminasa tisular y 6  $\mu$ g de Fn aumentaba la diferenciación osteoblástica en comparación con los grupos de transglutaminasa y Fn solas usadas como control. Sin embargo, el efecto de la adición de Fn no se mantuvo a lo largo de todo el periodo de duración del cultivo (Ball et al. 2009). Asimismo, el enriquecimiento de una matriz multicapa compuesta de quitosano-HA con moléculas de matriz extracelular producidas por osteoblastos o con Fn (25 o 50  $\mu$ g/mL) determinó un aumento del número de osteoblastos desde el primer día del cultivo, aunque tendía a disminuir transcurridos 7 días en todos los grupos de estudio (Fernández et al., 2012). Otros estudios *in vitro* también han observado resultados satisfactorios en algunos aspectos de la regeneración y la osteointegración de los implantes en superficies de titanio recubiertas por Fn y vitronectina (Rivera-Chacon et al., 2013) o una proteína de fusión del FGF-Fn (Park et al., 2006). En otro trabajo se encontró que las células osteoprogenitoras cultivadas en una aleación de Ti-6Al-4V limpiada rigurosamente demuestran un patrón normal de diferenciación de osteoblastos y se observó que la Fn preadsorbida estimula la diferenciación de los osteoblastos durante la fase de mineralización de la osteoblastogénesis (Rapuano et al., 2012).

Respecto a la experiencia clínica con el uso de Fn asociada a  $\beta$ -TCP y ADSCs en estudios previos de defectos críticos de la cortical vestibular mandibular y en los procesos de regeneración ósea de defectos de tipo dehiscencia asociados con la colocación simultánea de implantes en un modelo experimental canino, los resultados han sido poco concluyentes (Alvira-González et al., 2016; Sánchez-Garcés et al., 2017).

### 1.3 Modelos de regeneración ósea guiada y defectos de tamaño crítico

Los modelos en animales de experimentación para evaluar estrategias de ingeniería tisular y regeneración ósea precisan un diseño que permita la traslación clínica de dichas estrategias. Para ello deben cumplir ciertos criterios, tales como simular el ambiente clínico y biológico en el que la metodología experimental deba ser evaluada, así como asegurar la presencia de parámetros cuantificables para poder analizar el resultado desde un punto de vista cuantitativo, cualitativo y funcional (Muschler et al., 2010). En el campo de la investigación del sistema óseo se han utilizado una gran variedad de especies de mamífero. En una revisión del uso de modelos animales en estudios de reparación de fracturas publicados en 10 años en seis revistas de cirugía ortopédica, el orden de frecuencia de uso eran la rata en un 38% de los casos, el conejo en un 19%, el ratón en un 13%, la oveja en un 11%, el perro en un 9%, la cabra en un 4% y otros animales en un 4% (O'Loughlin et al., 2008). La investigación básica, estudios de viabilidad y pruebas de bioactividad dependen en gran medida del uso de modelos en ratas y ratones por la alta definición de los mismos desde un punto de vista biológico, genético e inmunológico, lo que asegura un alto grado de reproducibilidad (Gomes & Fernandes, 2011).

Actualmente se utilizan varios modelos *in vivo* con el propósito específico de evaluar el proceso de regeneración ósea, la interacción entre el hueso y el biomaterial, y la evidencia fisiopatológica de las vías de osificación y la modulación de las mismas (Donos et al., 2004, 2015). La construcción de defectos intraóseos en zonas que soportan peso permite evaluar la capacidad de biomateriales y matrices para reparar dichos defectos. Para ello se utilizan modelos ortotópicos basados en huesos de diferentes localizaciones, incluyendo la calota, los huesos largos, la mandíbula, así como defectos del hueso cortical

y esponjoso (Salgado et al., 2004).

El modelo de la calota es muy adecuado y ampliamente utilizado por las siguientes ventajas: la estructura de la calota permite crear un defecto uniforme, reproducible y estandarizado que se puede evaluar fácilmente por técnicas radiográficas e histológicas; su ubicación anatómica facilita el acceso quirúrgico y el manejo intraoperatorio; la duramadre y la piel superpuesta establecen un soporte adecuado para los materiales implantados sin necesidad de fijación interna o externa. Además, este modelo ha sido ampliamente utilizado y estudiado, lo que permite una comparación precisa de los resultados obtenidos con los materiales injertados (Gomes & Fernandes, 2011).

El uso del modelo de la calota implica tener que seleccionar el tamaño del defecto óseo, en función del animal utilizado. Los no críticos que son aquellos que durante su curso temporal se reparan espontáneamente, en tanto que los defectos óseos críticos son los que no llegan a repararse espontáneamente durante la vida del animal. En una revisión sistemática de la literatura para determinar qué dimensiones del defecto óseo de la calota de rata podrían ser consideradas de tamaño crítico, se estableció un diámetro de 5,0 mm (Vajgel et al., 2014).

## **Capítulo 2. MOTIVO Y JUSTIFICACIÓN**



Los procedimientos de ROG en Odontología son una práctica habitual y predecible con un elevado porcentaje de resultados satisfactorios (Retzepi & Donos, 2010). A pesar de los resultados satisfactorios obtenidos con el uso de xenoinjertos, aloinjertos o biomateriales aloplásticos, los injertos de hueso autólogo siguen siendo actualmente el patrón de comparación (*gold standard*) en los procedimientos de ROG (Sakkas et al., 2017).

El éxito o el fracaso de un material implantado depende de distintos factores, incluyendo los fenómenos de absorción y cambio de conformación de las proteínas cuando éste es insertado (Ball et al., 2009). El sistema autólogo de fibrinógeno/fibronectina (SAFF) conocido también como cola de fibrina, es un derivado del plasma humano que imita el último paso de la cascada de la coagulación mediante la activación del fibrinógeno por la trombina, provocando la formación de un coágulo de fibrina (Lekovic et al., 2015). Cuando se aplica en el lugar de cicatrización de la herida, el SAFF es capaz de sujetar los tejidos o materiales en una configuración necesaria. La Fn, un componente la cola de fibrina, ha demostrado desempeñar un papel importante en la adhesión fibroblástica y posiblemente también en la migración celular (Lekovic et al., 2015).

Dado que en estudios experimentales anteriores de nuestra línea de investigación en regeneración ósea mediante células madre adiposas asociadas a Fn y  $\beta$ -TCP como soporte (Alvira-González et al., 2016; Sánchez-Garcés et al., 2017), se encontraron diferencias en los análisis histomorfométricos, que no fueron concluyentes, en favor del uso de las ADSCs para promover la osteointegración, parecía necesario comprobar si el resultado obtenido en los anteriores estudios fue debido preferentemente al uso de las ADSCs o de la Fn asociada al  $\beta$ -TCP.



La asociación de los procedimientos de ROG con técnicas de ingeniería tisular que utilizan aloinjertos en combinación con alguna proteína que contiene moléculas bioactivas, tiene como objetivo regenerar los defectos óseos con un resultado similar al conseguido por los injertos de hueso autólogo (particulados o en bloque). Asimismo, su uso también pretende minimizar las complicaciones derivadas de la zona donante y acortar los periodos de cicatrización propios de la ROG con biomateriales exclusivamente. No obstante, los resultados publicados hasta el momento no son fácilmente comparables debido a su heterogeneidad y a la utilización de distintas proteínas junto a diferentes tipos de aloinjertos, siendo necesarios más estudios para establecer conclusiones más fundamentadas sobre la aplicabilidad real en el tratamiento de los defectos óseos.

De esta forma, se podría confirmar la utilidad del complejo regenerativo  $\beta$ -TCP-Fn como un método efectivo de regeneración ósea menos costoso, tanto respecto al coste biológico de obtención de dichas células madre como al económico, para conseguir resultados equivalentes, así como en qué medida la incorporación de la Fn supone una mejora en el comportamiento del  $\beta$ -TCP como material de regeneración ósea.

## **Capítulo 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### 3.1 Hipótesis

En base a la evidencia disponible en la literatura, se estableció la hipótesis principal de que el recubrimiento de la matriz de  $\beta$ -TCP con Fn ( $\beta$ -TCP-Fn) sería más eficaz para favorecer la regeneración ósea que la utilización de la matriz de  $\beta$ -TCP sin Fn. Para comprobar dicha hipótesis se seleccionó el modelo del defecto de tamaño crítico en la calota craneal de rata, evaluándose el tejido óseo neoformado por histomorfometría, a las 6 y 8 semanas del injerto.

La mayor eficacia de la matriz  $\beta$ -TCP-Fn en el proceso de regeneración ósea en comparación con  $\beta$ -TCP solo se definió por la formación de tejido óseo más precoz y por un incremento de la aposición de hueso alrededor de las partículas de la matriz a lo largo de las 6-8 semanas de duración del estudio. Así pues, el acortamiento del periodo de cicatrización y el aumento de la aposición ósea constituyeron las hipótesis secundarias.

En caso de que no se observaran diferencias entre las matrices de  $\beta$ -TCP con y sin Fn en ninguno de los parámetros evaluados se aceptaría la hipótesis nula y, por tanto, el resultado negativo del estudio.

### 3.2 Objetivos

El objetivo primario del estudio era comparar los resultados obtenidos en las variables histomorfométricas tras la aplicación de la matriz de  $\beta$ -TCP con y sin Fn en la regeneración ósea de defectos de tamaño crítico en la calota craneal de rata. Los objetivos secundarios incluían el tiempo de regeneración transcurrido y el porcentaje de

hueso neoformado en función del uso de  $\beta$ -TCP con y sin Fn.

## **Capítulo 4. MATERIAL Y MÉTODO**



## 4.1 Material

Se utilizó una matriz de  $\beta$ -TCP al 99% de pureza (KeraOs<sup>®</sup>, Keramat, A Coruña, España), en partículas de tamaño de 0,25 a 1 mm, sola o recubierta con Fn. Veinticuatro horas (h) antes de la intervención quirúrgica, se añadió 500  $\mu$ g de solución de Fn (10  $\mu$ g en medio de cultivo DMEM [*Dulbecco's Modified Eagle Medium*] 1 g/L) por cada gramo de injerto óseo, incubándose durante 24 h a 37°C. Seguidamente, se eliminó la solución de recubrimiento, los injertos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*, DPBS) y se almacenaron en recipientes multidosis en condiciones de esterilidad, listas para ser refrigeradas, transportadas y utilizadas tal como se ha descrito en estudios previos (Alvira-González et al., 2016; Sánchez-Garcés et al., 2017).

## 4.2 Diseño del estudio

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA 346-12) de la Universitat de Barcelona (Barcelona, España), según establece la Directiva Europea del Consejo Comunitario del 24 de noviembre de 1986 (86/609/ECC) y de acuerdo con la legislación y la normativa vigente de la Generalitat de Catalunya (documentos anexos).

Se diseñó un estudio prospectivo y controlado, en el que se incluyeron 30 ratas Sprague-Dawley, machos adultos, ex-reproductivos, de 14 semanas de edad y peso entre 250 y 300 g. Se estableció este criterio respecto a las características de los animales para minimizar el efecto de regeneración ósea espontánea que acontece en los animales jóvenes (Vajgel et al., 2014). Los animales se distribuyeron aleatoriamente a los grupos de estudio mediante tabla de aleación y se recogieron datos en situación basal y a las 6 y 8



semanas de la colocación de los injertos. Todos los animales se dispusieron en el mismo estabulario, en las mismas condiciones estándar de 12 h en ciclos de día y noche, a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura ambiente y  $50 \pm 10\%$  de humedad relativa. Cada animal se identificó con un número en la cola. Se utilizó un defecto de tamaño crítico en la calota craneal de la rata, ya que se trata de un modelo estándar, ventajoso desde el punto de vista económico y adecuado para evaluar la formación ósea en defectos óseos craneales (Vajgel et al., 2014).

### **4.3 Protocolo quirúrgico**

Para la inducción anestésica, se utilizó isofluorano al 5% (Forane<sup>®</sup>, Laboratorios Abbott, Madrid, España), 5 L/min, en una cámara anestésica. Se administró buprenorfina (0,05 mg/kg) (Buprex<sup>®</sup>, RB Pharmaceuticals Ltd., Slough, Berkshire, Reino Unido) por vía subcutánea. Como profilaxis antibiótica se administró una dosis única de 5 mg/mL de enrofloxacin (Baytril<sup>®</sup>, Bayer Hispania, Sant Joan Despí, Barcelona, España). Los animales se conectaron a un respirador (New Generation Black Mk-TCIII, NSS, Reino Unido) para el mantenimiento de la anestesia con un flujo de 0,7-0,8 L/min de oxígeno e isofluorano vaporizado 2-2,5% al  $3\frac{1}{2}$  L/min. (figura 1).

Seguidamente, se procedió al rasurado (figura 1) y desinfección del área quirúrgica con povidona iodada al 10% (Iodina<sup>®</sup>, Laboratorios Reig Jofré, Sant Joan Despí, Barcelona, España). La zona de la incisión se infiltró con 1 cc de articaína al 4% con adrenalina 1:100.000 (Ultracain<sup>®</sup>, Laboratorios Normon, Tres Cantos, Madrid, España) (figura 2). La incisión cutánea craneal se efectuó en dirección anteroposterior, siguiendo la sutura sagital, aproximadamente de 2 cm de longitud, desde el hueso occipital hasta el frontal

(figura 3). Se disecaron los planos subcutáneo y muscular, así como el periostio, para exponer la bóveda craneal (figura 4). Tras la exposición de los huesos parietales, se procedió a crear un defecto óseo mediante una fresa trefina de 5 mm de diámetro externo, conectada a un motor eléctrico a 2.000 rpm, e irrigación con suero salino estéril para evitar el sobrecalentamiento de los márgenes durante la ostectomía y limpieza de la zona (figura 5). Se crearon dos defectos bicorticales circulares de tamaño crítico en ambos huesos parietales (Gomes & Fernandes, 2011) (figuras 6 y 7). A continuación, un total de 30 defectos óseos se rellenaron con uno de los biomateriales de estudio ( $\beta$ -TCP y  $\beta$ -TCP-Fn), dejando 30 defectos vacíos como grupo control en el lado contralateral (figura 8). El material injertado,  $\beta$ -TCP o  $\beta$ -TCP-Fn, se asignó aleatoriamente y se introdujo hasta llenar el defecto óseo, sin proceder a compactarlo respecto a la distancia crítica entre las propias partículas para permitir la penetración de los vasos sanguíneos. Debido al diferente grosor del defecto craneal de las ratas, siguiendo el protocolo de Donos et al. (2004), no se calculó la colocación de una cantidad estandarizada de biomaterial. El diseño del estudio incluía el enmascaramiento del cirujano respecto al material injertado. Los defectos se cubrieron con una membrana de colágeno de bovino nativo (Collagen-Klee®, Medical Biomaterials Products GmbH, Neustadt, Glewe, Alemania) y el campo quirúrgico se cerró con suturas de Vicryl 3-0 (Laboratorios Aragón, Barcelona, España) para obtener una cicatrización por primera intención (figuras 9 y 10).

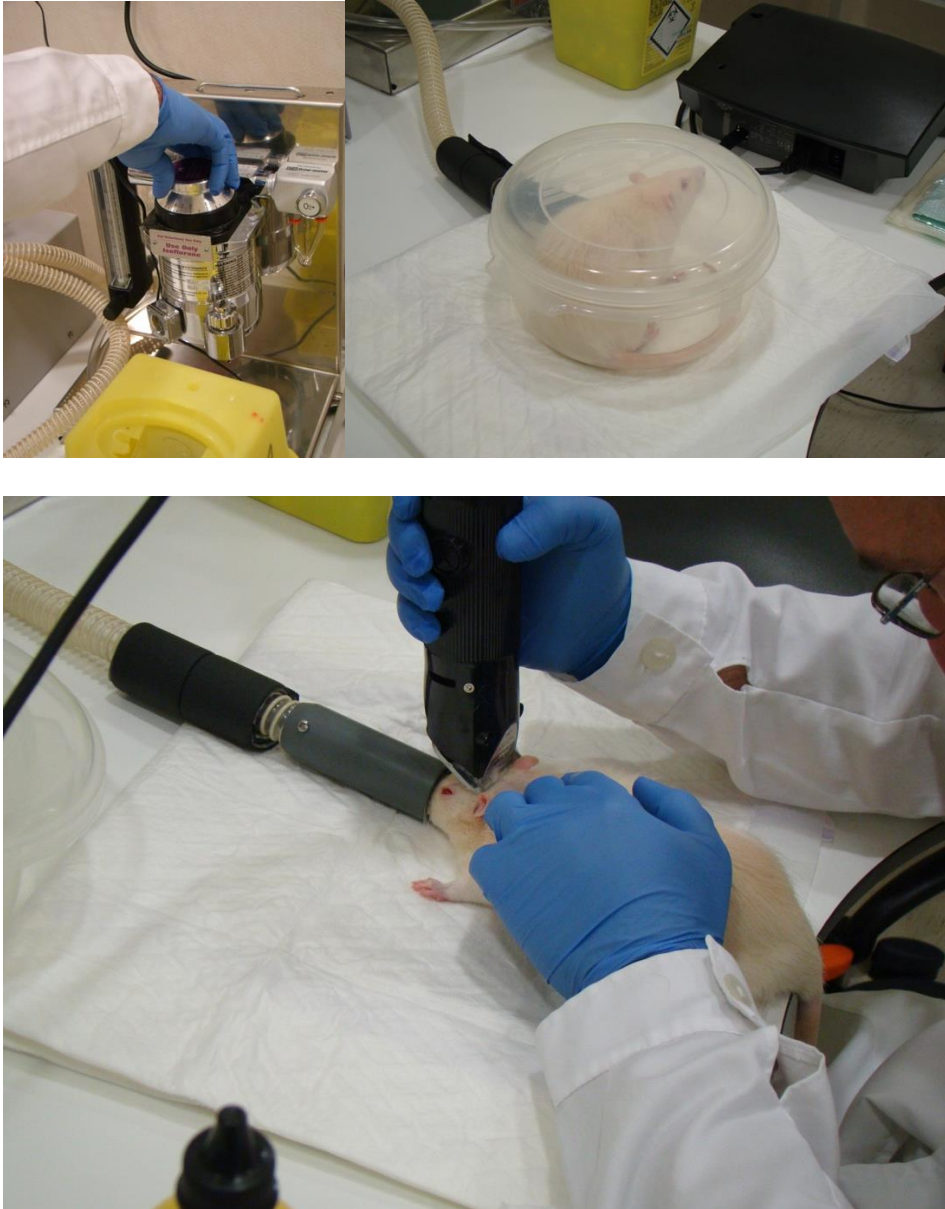


Figura 1. Superior Izquierda: Respirador (New Generation Black Mk-TCIII, NSS, Reino Unido) para el mantenimiento de la anestesia con un flujo de 0,7-0,8 L/min de oxígeno e isoflurano vaporizado 2-2,5% al 3½ L/min. Superior derecha: Inducción anestésica en cámara. Inferior: Rasurado prequirúrgico.



Figura 2. Infiltración subcutánea 1 cc de articaína al 4% con adrenalina 1:100.000.

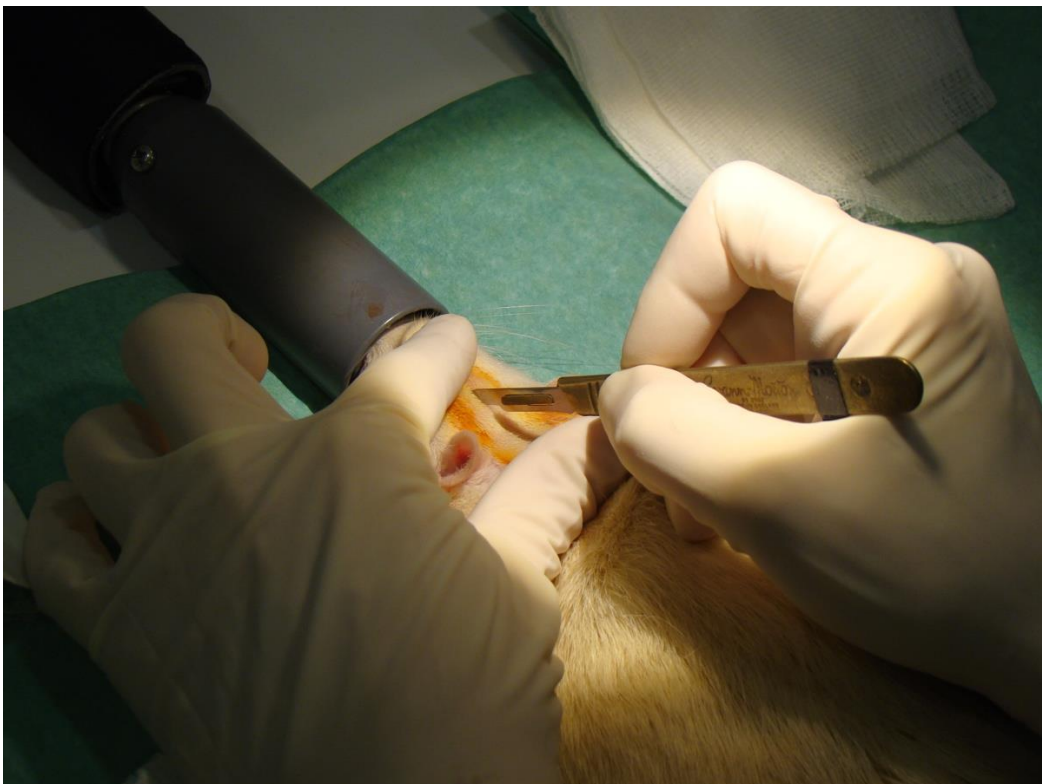


Figura 3. Incisión cutánea en línea media a espesor total.

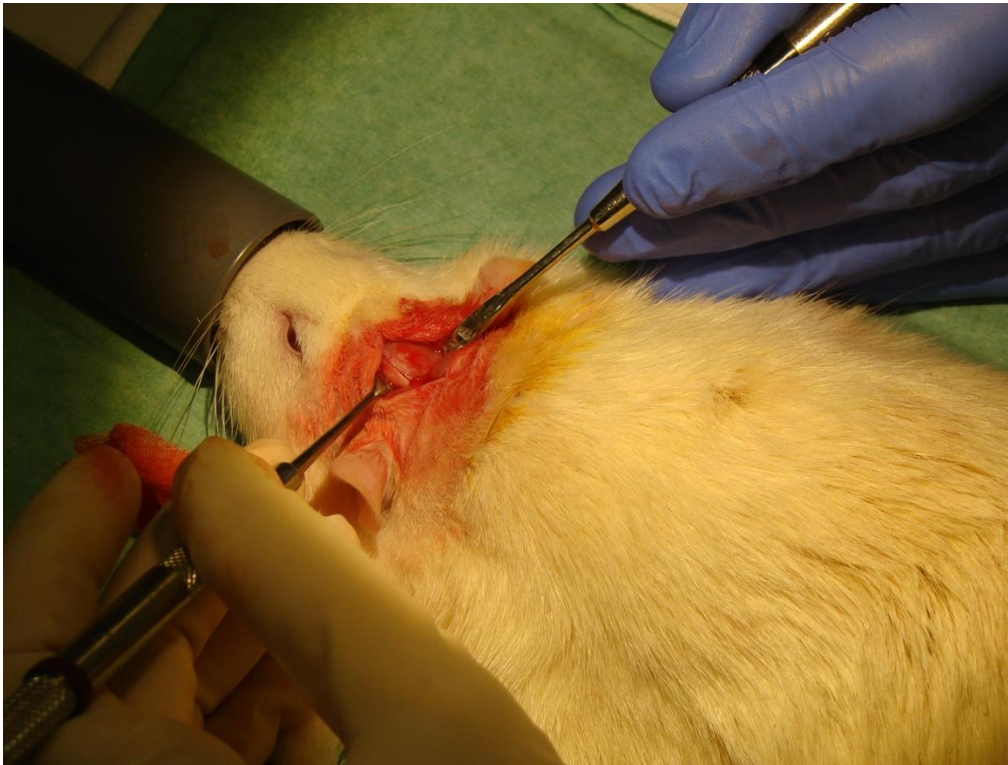


Figura 4. Diseción de los tejidos hasta llegar al plano óseo.

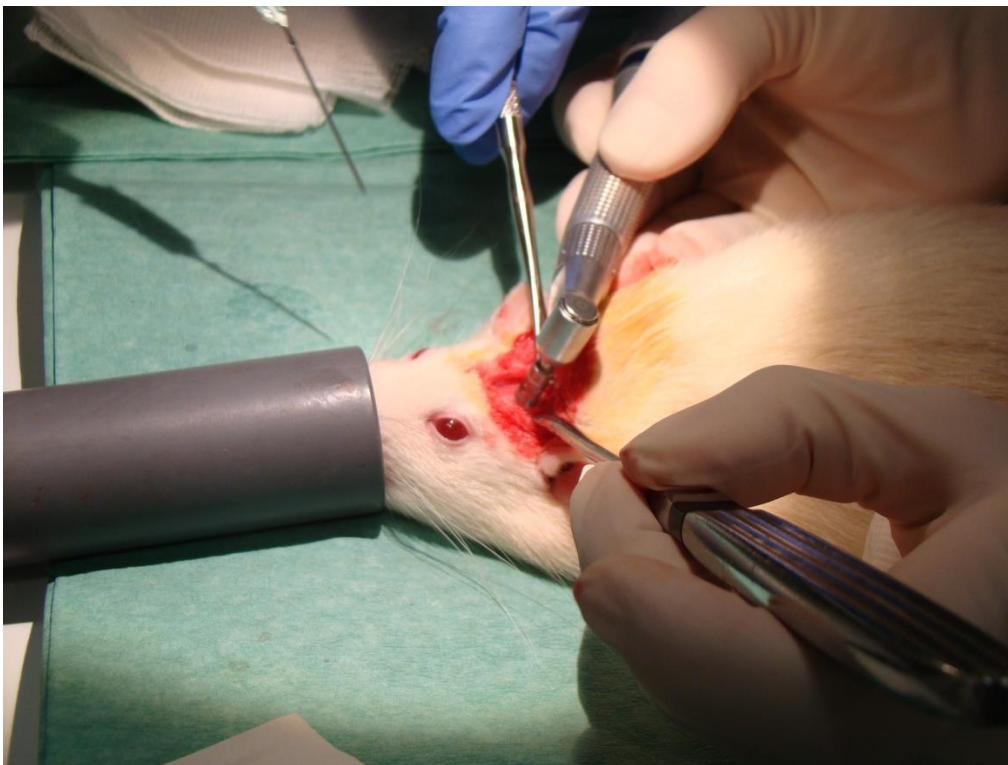


Figura 5. Ostectomía con trefina de 5 mm. de diámetro externo.



Figura 6. Imagen de la osteotomía derecha.



Figura 7. Osteotomía derecha finalizada. Maniobra de extracción de la calota del área de estudio en zona parietal izquierda.

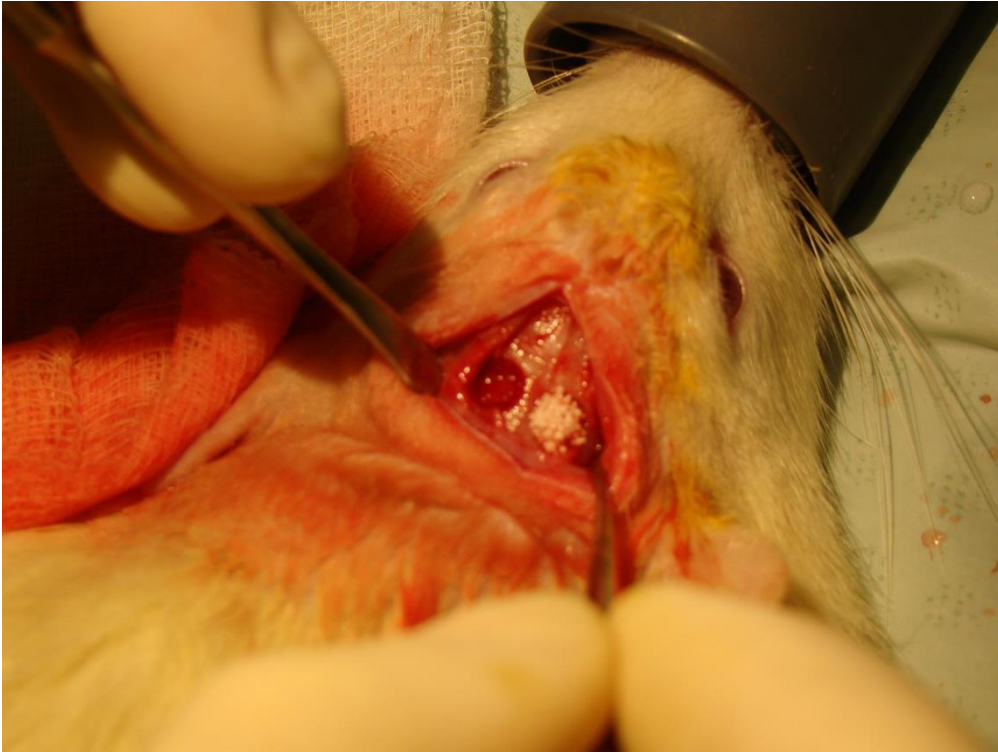


Figura 8. Defecto óseo crítico relleno con material (D) y defecto control vacío (I)



Figura 9. Membrana de colágeno de bovino nativo (Collagen-Klee®, Medical Biomaterials Products GmbH, Neustadt, Glewe, Alemania)

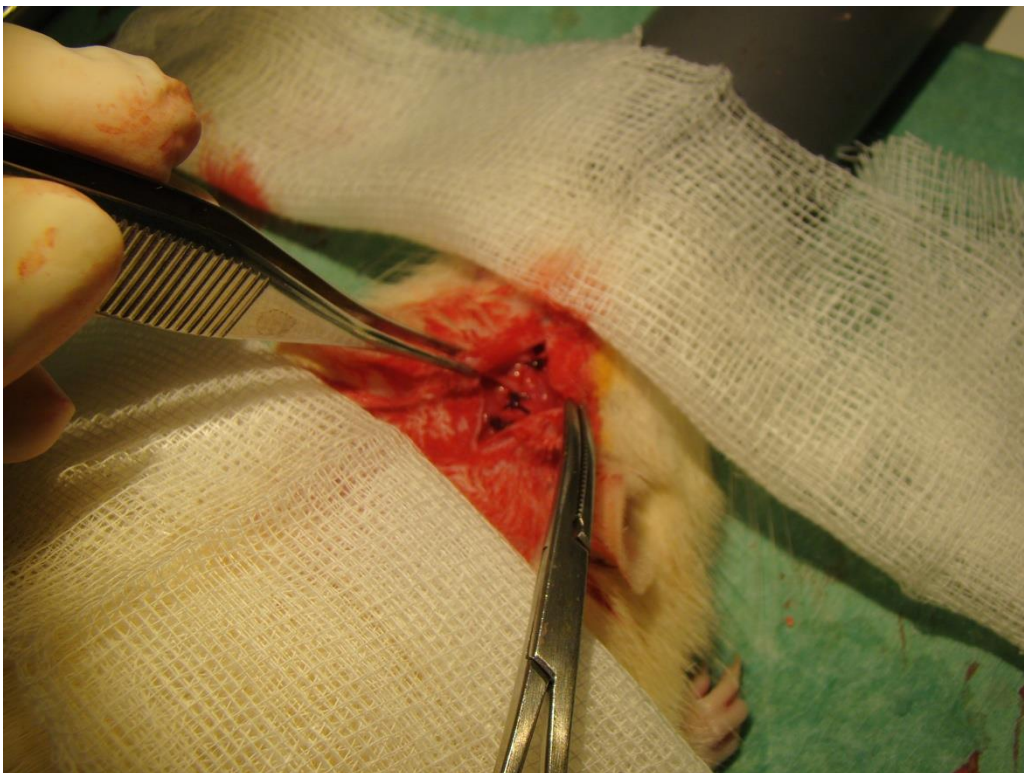
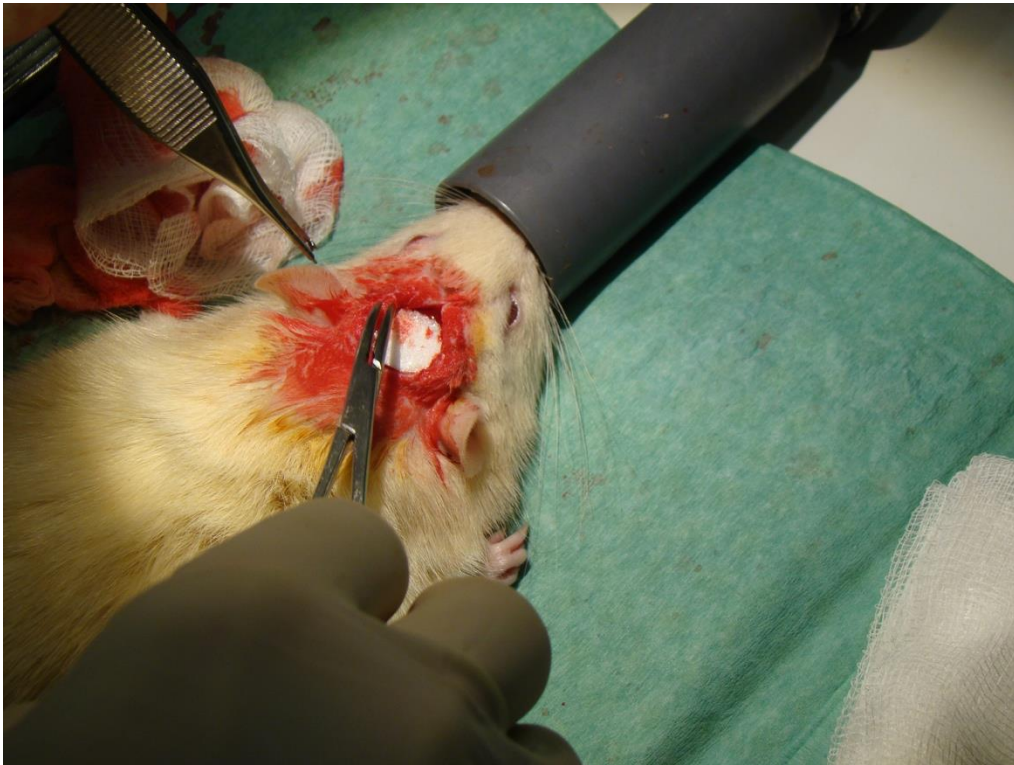


Figura 10. Superior: Colocación de la membrana de colágeno cubriendo ambos defectos óseos críticos. Inferior: Sutura del plano perióstico y muscular con Vicryl 3/0 (Laboratorios Aragón, Barcelona, Spain).





Figura 11. Administración subcutánea de meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Sant Cugat del Valles, Barcelona, España).

Durante el postoperatorio, se administró meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España), 2 mg/kg, por vía subcutánea, cada 24 h durante 2 días (figura 11). Los animales se mantuvieron en una alfombra caliente para prevenir la hipotermia postquirúrgica y se controlaron visualmente hasta que se despertaron de la anestesia, momento a partir del cual se trasladaron al estabulario en cajas individuales, con acceso *ad libitum* a alimentos y agua. Se retiraron las suturas a las 2 semanas de la intervención quirúrgica.

Todos los animales recibieron fluorocromos en una dosis de 25 mg/kg de oxitetraciclina (Calimicina 200, Laboratorios Calier. Les Franqueses del Vallés, Barcelona, España) una semana más tarde, además de 1 dosis de 10 mg/kg de calceína 1 día antes de la eutanasia ambas por vía subcutánea, con el fin de estudiar las muestras mediante microscopia de

fluorescencia. Los animales fueron sacrificados por exposición a CO<sub>2</sub> a las 6 y 8 semanas tras la intervención quirúrgica en función del grupo al que fueron asignados aleatoriamente.

De acuerdo con el tiempo de la eutanasia y el tipo de biomaterial utilizado, se obtuvieron cuatro grupos de estudio:

- $\beta$ -TCP-Fn 6 semanas (y su control no tratado).
- $\beta$ -TCP 6 semanas (y su control no tratado).
- $\beta$ -TCP-Fn 8 semanas (y su control no tratado).
- $\beta$ -TCP 8 semanas (y su control no tratado).

#### **4.4 Obtención de las muestras y preparación histológica**

Para la obtención de las muestras de estudio, se procedió a extraer la porción de bóveda craneal que rodeaba al defecto óseo y se fijó en una solución de formalina neutra tamponada al 4%, a 4°C durante 1 semana. A continuación, los cráneos se dividieron en dos mitades mediante una hoja de sierra de precisión (Exakt, Norderstedt, Germany). Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y posteriormente se incluyeron en una base de resina de metacrilato fotopolimerizable (Technovit 7200 VLC, Heraeus-Kulzer, Werheim, Germany). Los bloques polimerizados se sometieron al procedimiento Exakt de corte-pulido (Exakt, Norderstedt, Alemania), siguiendo un método estandarizado (Donath & Breuner, 1982). Las secciones obtenidas correspondían a la zona central del defecto óseo y presentaban una orientación paralela a la sutura sagital. Los bloques se cortaron en secciones de 200  $\mu$ m de grosor, reduciéndose posteriormente mediante pulido a un grosor aproximado de 40  $\mu$ m. Las preparaciones se

tiñeron según el método de Laczko & Levai (1975).

#### 4.5 Análisis histomorfométrico

Los estudios histomorfométricos se llevaron a cabo por un investigador con experiencia (F.M.), en condiciones de enmascaramiento respecto al estudio experimental. Para capturar las imágenes se utilizó un microscopio óptico (BX51, Olympus, Tokyo, Japón) conectado a una cámara digital (DP71, Olympus, Japón) ensamblado a un equipo motorizado (Märzhäuser, Steindorf, Alemania). Las imágenes obtenidas se alineaban y fusionaban automáticamente, permitiendo obtener imágenes completas del defecto a 100x aumentos.

Las proporciones ocupadas por hueso, biomateriales y tejidos blandos de los defectos se identificaron a partir de las imágenes histológicas, usando un lápiz óptico (Cintiq, Wacom, Alemania), coloreado (Photoshop, Adobe, E.E.U.U.) y medición digitalizada mediante dos sistemas automatizados de análisis de imagen (CellSens, Olympus Corporation, Japón; ImageProPremier, Media Cybernetics, E.E.U.U.) (figura 12). Para cada sección central de los defectos, siguiendo las recomendaciones previamente publicadas (Benic et al., 2016), se evaluaron las variables histomorfométricas que se definen a continuación:

- Diámetro del área del defecto óseo (o defecto previo) correspondiente al área ocupada por hueso extraída durante la intervención quirúrgica (variable descriptiva).
- Área aumentada (AA) dentro del defecto óseo original (variable primaria de resultado).
- Área de matriz ósea mineralizada (*mineralized bone matrix*, MBM).

- Tejido no mineralizado (*non-mineralized tissue, NMT*).
- Sustituto óseo (*bone substitute, BS*) residual ( $\text{mm}^2$  y porcentaje) en la AA (variables secundarias de resultado).

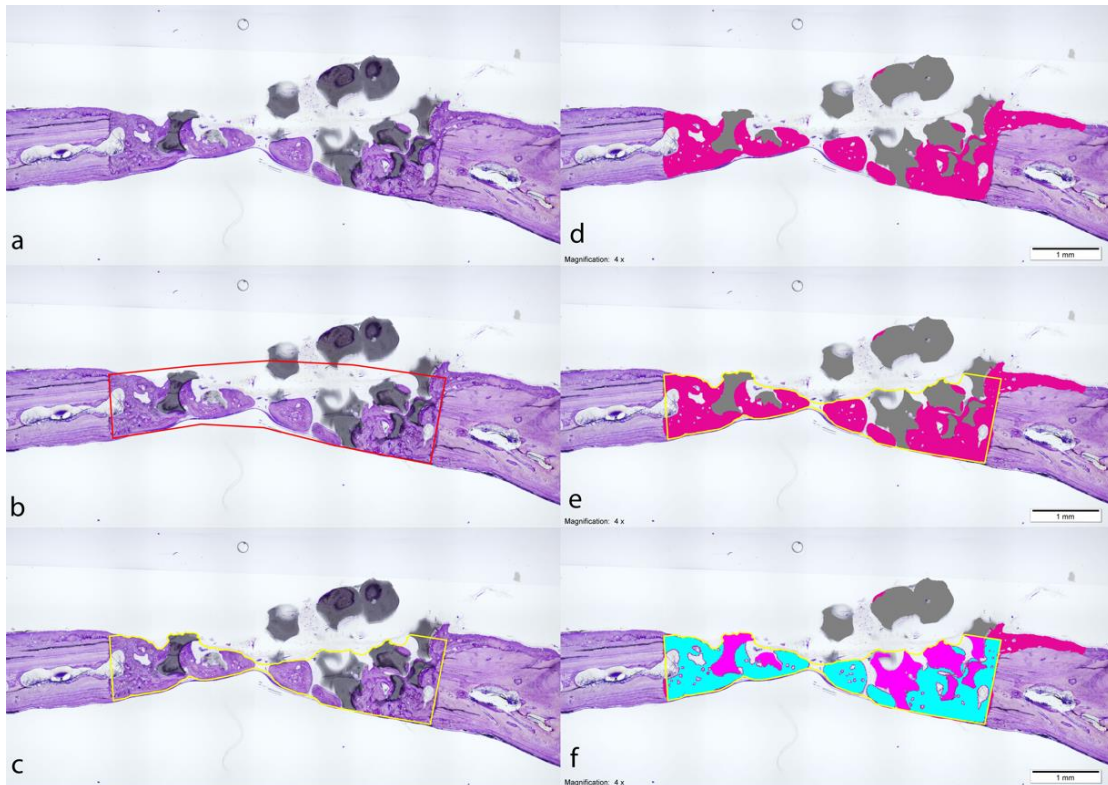


Figura 12. Análisis histomorfométrico. Definición de las áreas diana partir de un procedimiento de edición digital. Imagen original: (a). La región del área del defecto (DA) se definió como el área ocupada por el hueso extraído durante la cirugía. La interfaz entre el hueso nuevo y el hueso prístino se detectó, se describió y finalmente se vinculó siguiendo la curvatura del cráneo con líneas rectas (polígono rojo). Se evitó el aumento del espesor cortical causado por la reacción perióstica (b). La región del área aumentada (AA) se perfila (polígono amarillo) siguiendo la superficie de la DA ocupada por la matriz ósea mineralizada (MBM) y el sustituto óseo (BS) (c). Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo) y BS se colorearon (d) y el AA se superpuso (e). El software de análisis de imágenes calculó el área de MBM y BS dentro de AA (f). Levai - Laczkó  $\times 40$ .

El tejido óseo neoformado se expresa como porcentaje (para homogeneizar todas medidas) y como  $\text{mm}^2$  del área diana, calculado como AA más tejido ganado (*gained*

tissue, GT). Se ha empleado el término “matriz ósea mineralizada” (MBM) siguiendo las recomendaciones de la *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) en referencia a la nomenclatura estandarizada de histomorfometría ósea (Dempster et al., 2013). La presentación de este trabajo sigue las guías ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) para las publicaciones de estudios preclínicos en animales de experimentación (Kilkenny et al., 2010).

#### **4.6 Análisis estadístico**

Para comparar ambos tratamientos con biomateriales activos ( $\beta$ -TCP-Fn vs  $\beta$ -TCP), se estableció un tamaño muestral de 15 animales por grupo, lo que permitía una potencia estadística del 80% para detectar diferencias entre grupos para un t-test de contraste bilateral, con un nivel de significación del 5% y un tamaño del efecto 1:1. Para garantizar la validez interna del estudio, cada animal también se evaluó bajo condiciones de control. Las variables cuantitativas se expresan como media y desviación estándar (DE) y las variables categóricas como frecuencias y porcentajes. Para comparar los tratamientos y analizar el efecto del tiempo y sus interacciones, se utilizó un modelo mixto, considerando los animales como factor aleatorio. Para cada punto del seguimiento (6 y 8 semanas), las comparaciones pareadas entre grupos se efectuaron mediante la corrección de Turkey para comparaciones múltiples. Todos los modelos se validaron cualitativamente, examinando gráficamente la distribución de las varianzas residuales. Los análisis se efectuaron con el paquete estadístico R v3.12 (Development Core Team 2008). Se estableció un nivel de significación estadística de  $P < 0,05$ .

## **Capítulo 5. RESULTADOS**



De las 30 ratas incluidas en el estudio, un animal murió a las 48 horas de la intervención quirúrgica por complicaciones postoperatorias (número 25 de la tabla de aleatorización), de modo que el grupo de estudio estuvo formado por 29 animales que implicaban un total de 58 muestras de estudio. Sin embargo, una muestra correspondiente a las 8 semanas y del grupo  $\beta$ -TCP-Fn tenía una forma extremadamente irregular y fue rechazada para su análisis histomorfométrico (número 15 de la tabla de aleatorización). En total, el análisis histomorfométrico se llevó a cabo en 58 muestras, 29 recogidas a las 6 semanas de la cirugía y las 29 restantes, a las 8 semanas (figura 13). La distribución respecto a los biomateriales fue la siguiente: 13 (22,4%) muestras en el grupo  $\beta$ -TCP-Fn, 16 (27,6%) en el grupo  $\beta$ -TCP y 29 (50%) en el grupo control no tratado.

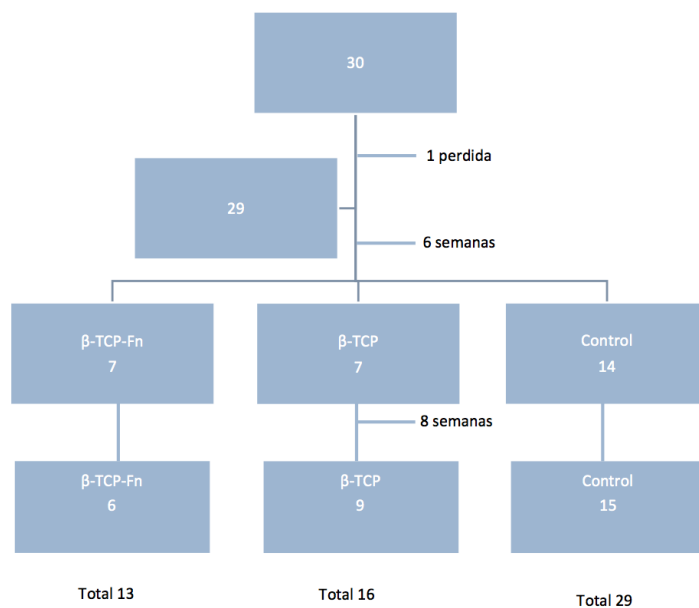


Figura 13. Diagrama de distribución de las muestras obtenidas para su estudio.

El diámetro medio (DE) del defecto óseo era de 4,95 (0,41) mm, siendo comparable respecto a los grupos de tratamiento ( $P = 0,147$ ) y semanas de seguimiento ( $P = 0,786$ ). La



media del área diana fue de 4,79 (1,24) mm<sup>2</sup>, con diferencias estadísticamente significativas ( $P = 0,0004$ ) entre los grupos de estudio, principalmente entre  $\beta$ -TCP-Fn y los controles (5,66 [1,48] vs 4,23 [0,92] mm<sup>2</sup>;  $P = 0,0007$ ) y entre  $\beta$ -TCP y los controles (5,11 [1,13] vs 4,23 [0,92] mm<sup>2</sup>;  $P = 0,029$ ) (tabla 1).

### 5.1 Área aumentada (AA)

Considerando la extensión compuesta por MBM y NMT y/o BS, expresado como porcentaje del área diana, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de relleno con biomaterial activo ( $\beta$ -TCP-Fn y  $\beta$ -TCP) en comparación con los controles (87,0% [20,1] y 92,5% [14,5], respectivamente vs 58,6% [20,4];  $P < 0,001$ ) (tabla 1). A las 6 y 8 semanas, los valores de AA también eran significativamente mayores en los grupos de tratamiento que en los controles, especialmente en el grupo del  $\beta$ -TCP-Fn a las 6 semanas. (tabla 1) (figura 14).

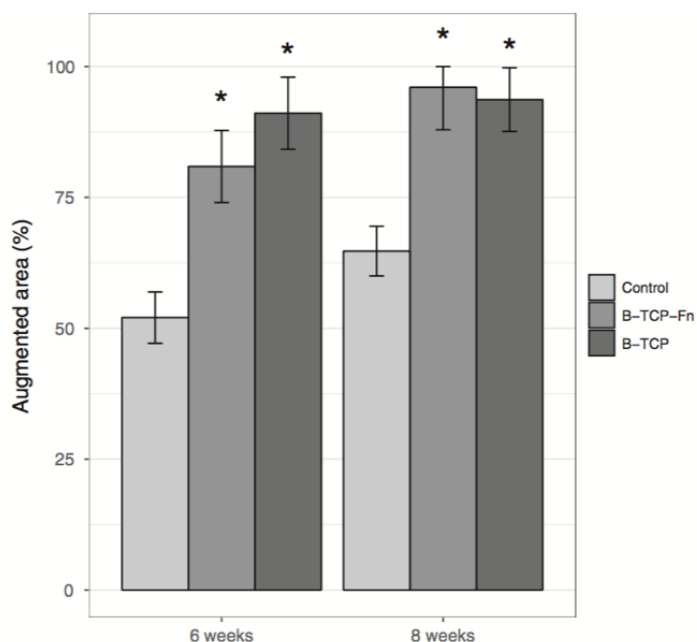


Figura 14. Porcentaje de área aumentada (AA) dentro del área diana por grupos de tratamiento y períodos de estudio (datos expresados como media y desviación)

estándar; \* diferencias estadísticamente significativas para la comparación de  $\beta$ -TCP-Fn y  $\beta$ -TCP vs. controles).

No se detectaron diferencias intra-grupo en las comparaciones del porcentaje de AA entre las 6 y 8 semanas en ninguno de los grupos de estudio, excepto para  $\beta$ -TCP-Fn en el que se encuentra un valor en  $\text{mm}^2$  próximo a la significancia ( $P = 0,05$ ).

## 5.2 Matriz ósea mineralizada (MBM)

En relación con el efecto del biomaterial injertado sobre la MBM, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos frente a los controles cuando la MBM se expresaba como porcentaje del área diana (tabla 1). No obstante, en el grupo del  $\beta$ -TCP-Fn cuando se consideraba el valor absoluto de MBM, se observó una diferencia estadísticamente significativa respecto al aumento del área MBM entre las 6 y 8 semanas (1,14 [1,14]  $\text{mm}^2$  y 2,23 [1,16]  $\text{mm}^2$ , respectivamente;  $P = 0,041$ ). Asimismo, el aumento del área MBM de las 6 a las 8 semanas era de mayor magnitud en los grupos de tratamiento que en los controles, aunque sin que la diferencia fuera estadísticamente significativa ( $\beta$ -TCP-Fn del 19,6% al 37,4%;  $\beta$ -TCP del 16,2% al 22,7%; controles del 28,1% al 32,3%). El grupo  $\beta$ -TCP-Fn dobla su valor en  $\text{mm}^2$  respecto al área de MBM entre las 6 y 8 semanas (1,14 [1,14]  $\text{mm}^2$  y 2,23 [1,16]  $\text{mm}^2$ ), mientras que el grupo  $\beta$ -TCP se mantiene prácticamente estable a lo largo de este período (0,95 [0,85]  $\text{mm}^2$  y 1,04 [0,62]  $\text{mm}^2$ ) (tabla 1) (figura 15 y 16).

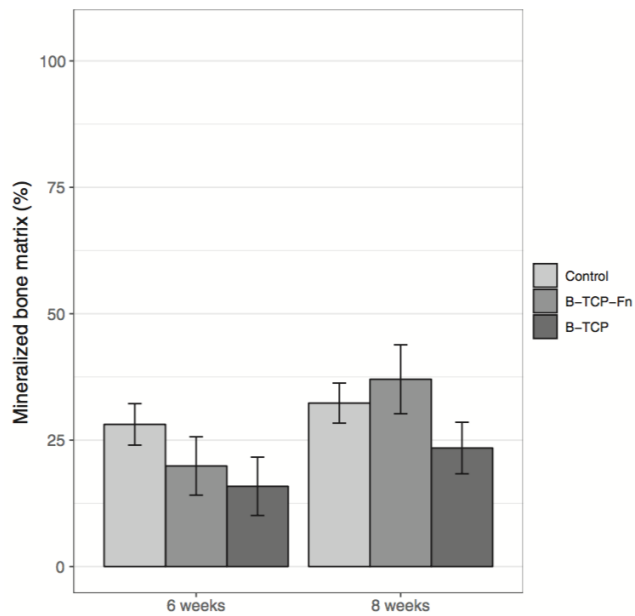


Figura 15. Porcentaje de matriz de mineral mineralizada (MBM) dentro del área objetivo por grupos de tratamiento y períodos de estudio. Los grupos  $\beta$ -TCP - Fn y  $\beta$ -TCP mostraron valores más altos que en los controles, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (datos expresados como media y desviación estándar).

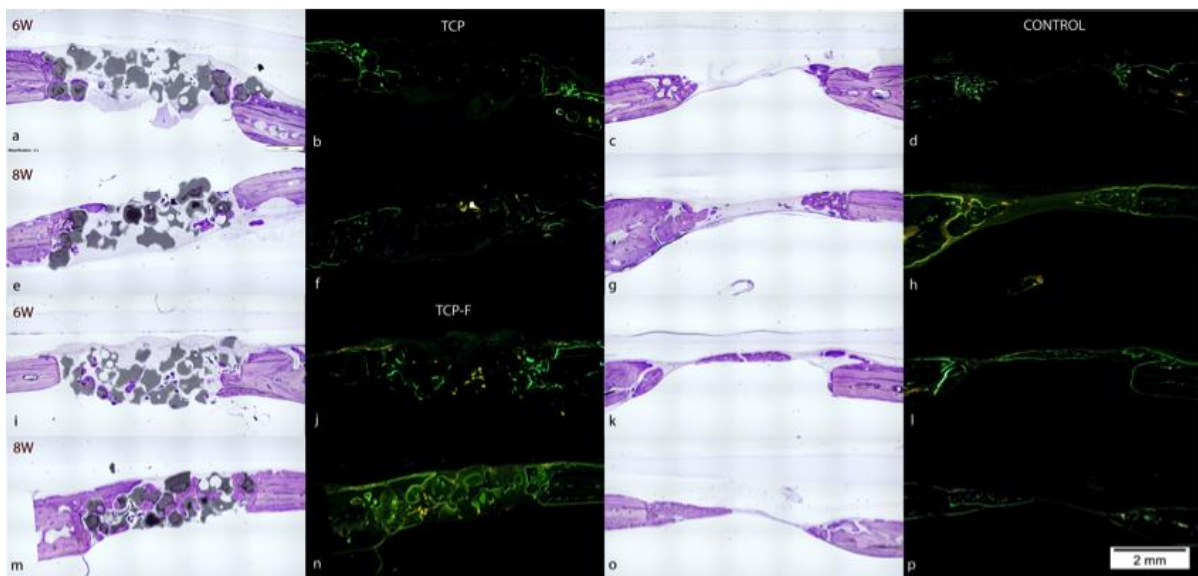


Figura 16. Imágenes representativas de los defectos rellenos con TCP o PC-Fn (lado izquierdo) y control (lado derecho) a las 6 y 8 semanas respectivamente. Una semana antes de sacrificar a los animales, recibieron una dosis de fluorocromo (verde de calceína) por vía subcutánea (imágenes b, d, f, h, j, l, n, p). Se pueden observar

diferencias entre los sitios de control y de prueba en relación con el hueso mineralizado (MBM) y el área aumentada (AA) dentro de los defectos. La tinción de Levai-Laczkó (imágenes a, c, e, g, i, k, m, o) es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. El sustituto óseo se muestra en gris. Ampliación  $\times 4$ .

### 5.3 Sustituto óseo (BS)

Este parámetro histomorfométrico se evaluó solamente en los dos grupos de tratamiento activo. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en BS entre los defectos óseos injertados con  $\beta$ -TCP-Fn o  $\beta$ -TCP, el porcentaje de BS en el área diana a las 8 semanas era algo superior en el grupo tratado con  $\beta$ -TCP-Fn (31,5% [10,1]) que en grupo tratado con  $\beta$ -TCP (29,2% [11,7]) (tabla 1) (figura 17).

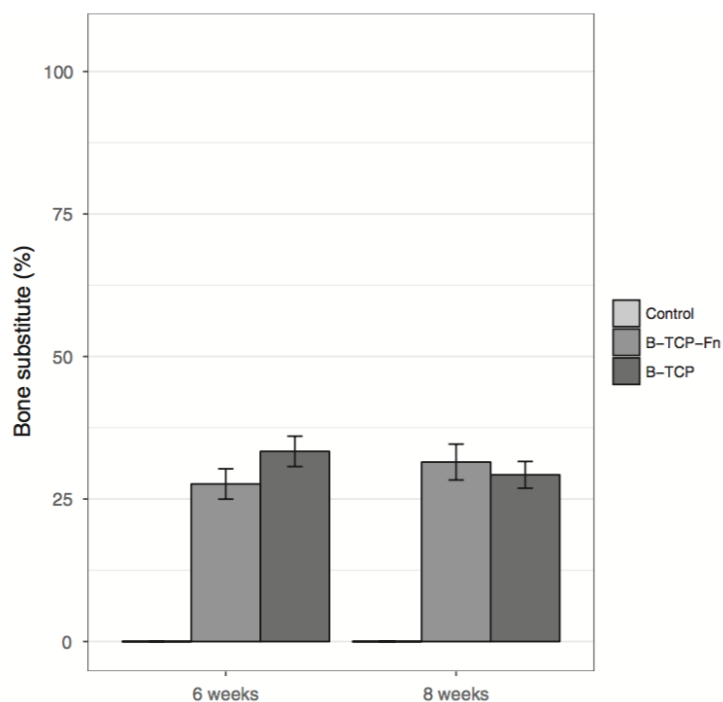


Figura 17. Porcentaje de sustituto de huesos (BS) dentro del área diana por grupos de tratamiento y períodos de estudio (datos expresados como media y desviación estándar).

## 5.4 Tejido ganado (GT)

El TG en el área diana era significativamente mayor en los grupos de tratamiento que en los controles ( $\beta$ -TCP-Fn 56,3 [19,6] mm<sup>2</sup> vs controles 30,3 [15,6] mm<sup>2</sup>,  $P < 0,001$ ;  $\beta$ -TCP 50,9 [15,1] mm<sup>2</sup> vs controles 30,3 [15,6] mm<sup>2</sup>,  $P = 0,0004$ ) (tabla 1). No se observaron diferencias entre los dos grupos de tratamiento activo, excepto en el GT global a las 8 semanas ( $P = 0,003$ ). Las comparaciones con los controles a las 6 y 8 semanas fueron estadísticamente significativas en favor de los grupos de tratamiento, tanto si se expresaba el GT en porcentaje de tejido del área diana, como en valores absolutos (mm<sup>2</sup>). En la comparación en mm<sup>2</sup> entre los grupos  $\beta$ -TCP-Fn y  $\beta$ -TCP a las 8 semanas se observa una diferencia estadísticamente significativa a favor del grupo  $\beta$ -TCP-Fn ( $\beta$ -TCP-Fn 4,25 [1,39] mm<sup>2</sup> vs  $\beta$ -TCP 2,38 [0,88]  $P = 0,003$ ) (tabla 1) (figura 18).

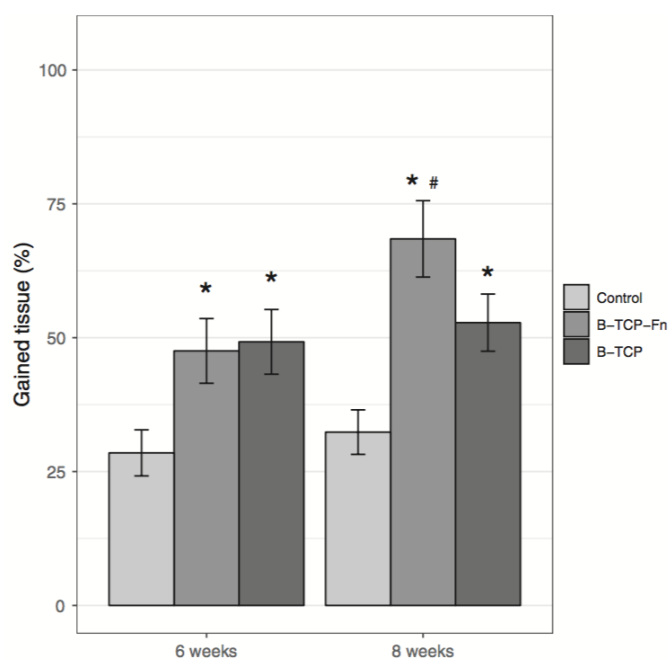


Figura 18. Porcentaje de tejido ganado(GT) dentro del área diana por grupos de tratamiento y períodos de estudio (datos expresados como media y desviación estándar; \* diferencias estadísticamente significativas para la comparación de  $\beta$ -TCP-Fn y  $\beta$ -TCP vs. controles; # diferencia estadísticamente significativa para la comparación dentro del grupo entre 6 y 8 semanas.

Variables histomorfométricas	Grupos de estudio				Comparación entre grupos			Comparación intragrupos		
	$\beta$ -TCP-Fn	$\beta$ -TCP	Control	Valor P global	Valor P $\beta$ -TCP-Fn vs. $\beta$ -TCP	Valor P $\beta$ -TCP-Fn vs. control	Valor P $\beta$ -TCP vs. control	Valor P $\beta$ -TCP-Fn 6 vs. 8 semanas	Valor P $\beta$ -TCP 6 vs. 8 semanas	Valor P controles 6 vs. 8 semanas
<b>Diámetro del defecto, mm</b>										
Global	5,10 (0,09)	5,03 (0,19)	4,84 (0,54)	0,1470	0,8918	0,1847	0,3315			
6 semanas	5,10 (0,09)	5,07 (0,09)	4,89 (0,37)	0,4543	0,9889	0,5124	0,6121			
8 semanas	5,11 (0,09)	4,99 (0,25)	4,80 (0,67)	0,2955	0,8736	0,3366	0,5187	0,9786	0,7164	0,5763
<b>Área diana, mm<sup>2</sup></b>										
Global	5,66 (1,48)	5,11 (1,13)	4,23 (0,92)	0,0004	0,2714	0,0007	0,0291			
6 semanas	5,30 (1,07)	5,41 (1,21)	4,45 (0,93)	0,0657	0,9969	0,1609	0,1362			
8 semanas	6,16 (1,94)	4,87 (1,07)	4,02 (0,89)	0,0013	0,0803	0,0012	0,1616	0,1990	0,3178	0,3042
<b>Área aumentada en el área diana, mm<sup>2</sup></b>										
Global	5,03 (2,04)	4,71 (1,26)	2,46 (1,02)	<,0001	0,6834	<,0001	<,0001			
6 semanas	4,37 (1,87)	4,97 (1,33)	2,32 (0,85)	0,0003	0,6939	0,0062	0,0006			
8 semanas	5,94 (2,08)	4,51 (1,24)	2,60 (1,18)	<,0001	0,1473	0,0001	0,0053	0,0544	0,5062	0,5722
<b>Área aumentada, % del área diana</b>										
Global	87,0 (20,1)	92,5 (14,0)	58,6 (20,4)	<,0001	0,8424	0,0001	<,0001			
6 semanas	80,8 (25,0)	91,2 (8,7)	52,0 (14,0)	<,0001	0,5512	0,0036	0,0001			
8 semanas	95,6 (4,7)	93,5 (17,6)	64,7 (23,8)	0,0003	0,9702	0,0052	0,0014	0,1684	0,7806	0,0750
<b>Matriz ósea mineralizada, mm<sup>2</sup></b>										
Global	1,60 (1,23)	1,00 (0,70)	1,25 (0,73)	0,1071	0,0908	0,2442	0,5558			
6 semanas	1,14 (1,14)	0,95 (0,85)	1,22 (0,76)	0,7113	0,8391	0,9902	0,6896			
8 semanas	2,23 (1,16)	1,04 (0,62)	1,27 (0,72)	0,0496	0,0486	0,0720	0,7975	0,0414	0,7335	0,8588
<b>Matriz ósea mineralizada, % del área diana</b>										
Global	27,0 (18,1)	19,8 (13,7)	30,3 (15,6)	0,0847	0,3080	0,9362	0,0712			
6 semanas	19,6 (14,2)	16,2 (13,9)	28,1 (14,3)	0,1658	0,8741	0,4523	0,1848			
8 semanas	37,4 (19,1)	22,7 (13,5)	32,3 (17,0)	0,2272	0,2630	0,8105	0,3289	0,0669	0,3351	0,4677
<b>Sustituto óseo, mm<sup>2</sup></b>										
Global	1,65 (0,92)	1,59 (0,61)	NA	0,7860	0,7860	NA	NA			
6 semanas	1,39 (0,67)	1,92 (0,48)	NA	0,1817	0,1817	NA	NA			
8 semanas	2,02 (1,18)	1,34 (0,59)	NA	0,1024	0,1024	NA	NA	0,1458	0,1245	NA
<b>Sustituto óseo, % del área diana</b>										
Global	29,2 (9,8)	31,0 (10,2)	NA	0,6649	0,6649	NA	NA			
6 semanas	27,7 (10,0)	33,3 (8,2)	NA	0,3074	0,3074	NA	NA			
8 semanas	31,5 (10,1)	29,2 (11,7)	NA	0,6986	0,6986	NA	NA	0,5283	0,4337	NA
<b>Tejido ganado, mm<sup>2</sup></b>										
Global	3,25 (1,75)	2,59 (0,85)	1,25 (0,73)	<,0001	0,1202	<,0001	0,0001			
6 semanas	2,53 (1,69)	2,87 (0,80)	1,22 (0,76)	0,0009	0,7992	0,0160	0,0020			
8 semanas	4,25 (1,39)	2,38 (0,88)	1,27 (0,72)	<,0001	0,0037	<,0001	0,0268	0,0044	0,3365	0,8801
<b>Tejido ganado, % del área diana</b>										
Global	56,3 (19,6)	50,9 (15,1)	30,3 (15,6)	<,0001	0,4631	<,0001	0,0004			
6 semanas	47,2 (20,2)	49,5 (12,5)	28,1 (14,3)	0,0058	0,9617	0,0325	0,0149			
8 semanas	68,9 (9,9)	52,0 (17,5)	32,3 (17,0)	<,0001	0,1471	0,0001	0,0140	0,0243	0,7619	0,4804

Tabla 1. Resultados de las variables histomorfométricas. Datos expresados como media (DE); NA: no aplicable.

Las imágenes del estudio histomorfométrico de los animales 18 (figuras 18 y 20), 8 (figuras 21 y 22), 21 (figuras 23 y 24) y 6 (figuras 25 y 26), se muestran a continuación.

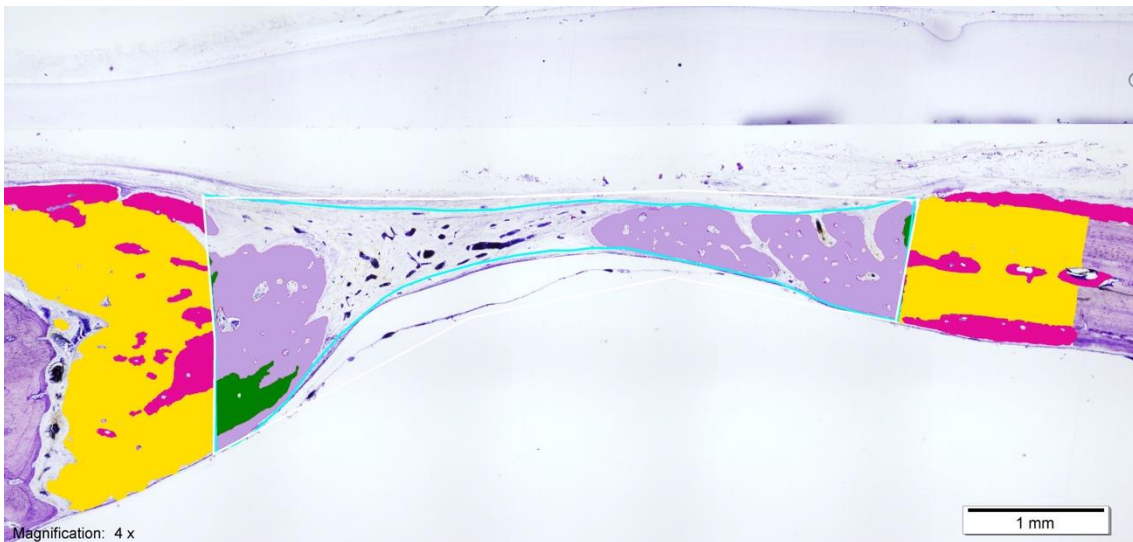
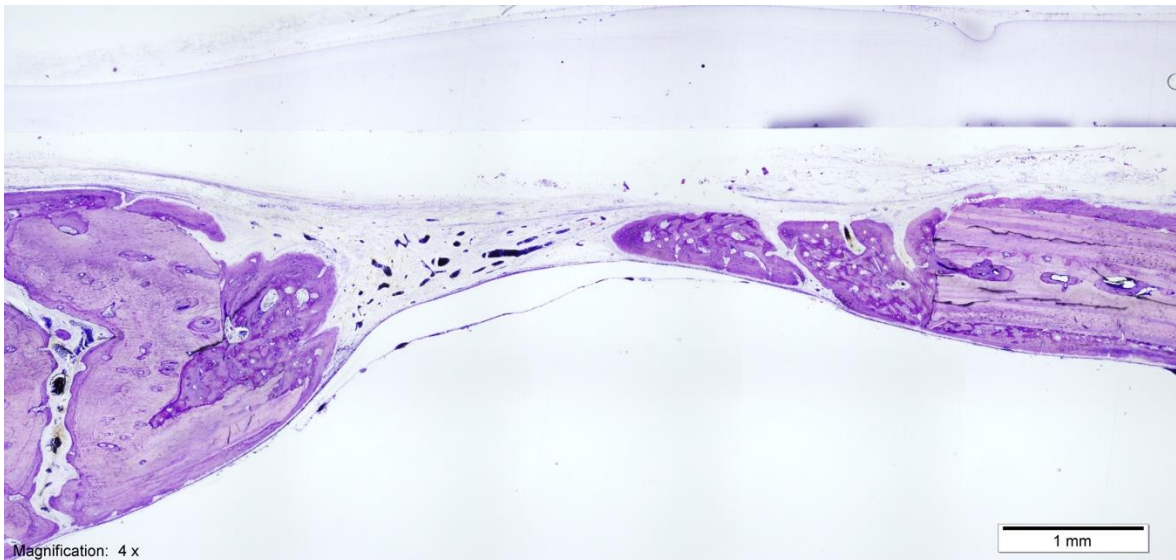


Figura 19. Muestras del defecto control de la rata 18L a las 6 semanas. Superior: La tinción de Levai-Laczkó es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. Inferior: Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo). Magnificación  $\times 4$ .

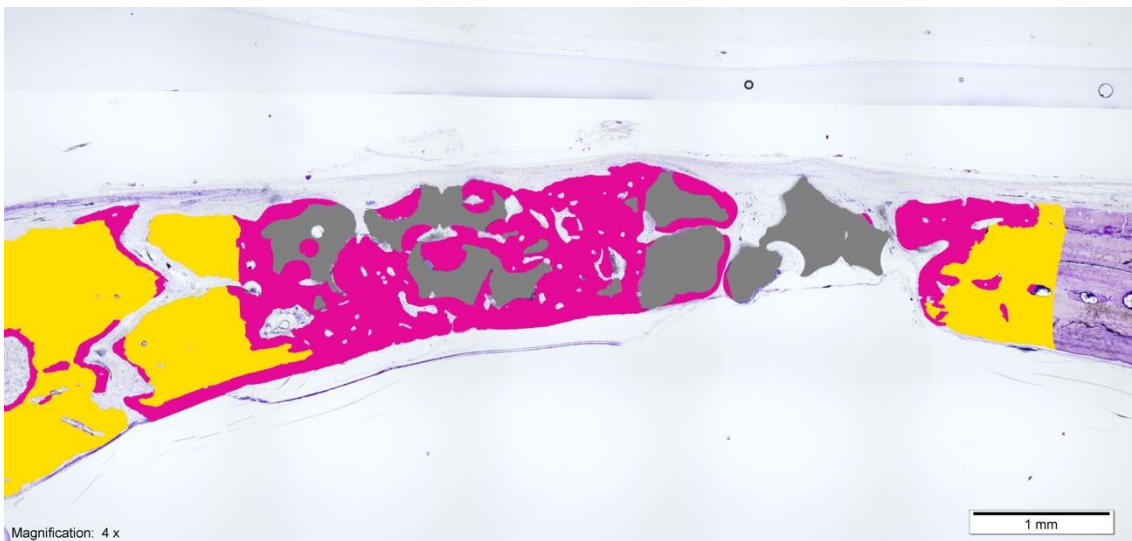
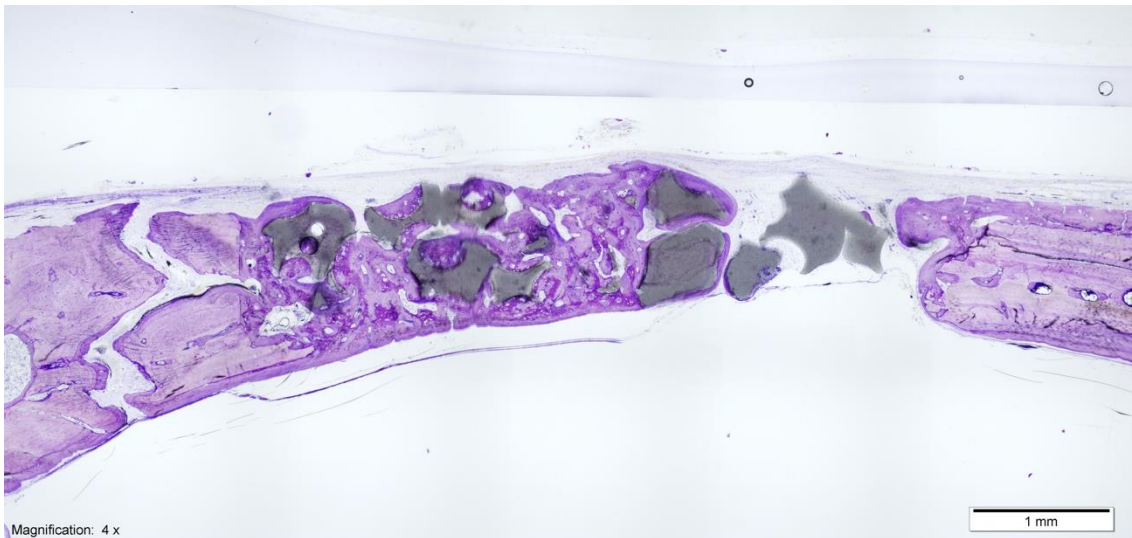


Figura 20. Muestras del defecto rellenado con TPC de la rata 18D a las 6 semanas. Superior: La tinción de Leiva-Laczkó es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. Inferior: El sustituto óseo se muestra en gris. Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo) y BS se colorearon. Magnificación  $\times 4$ .



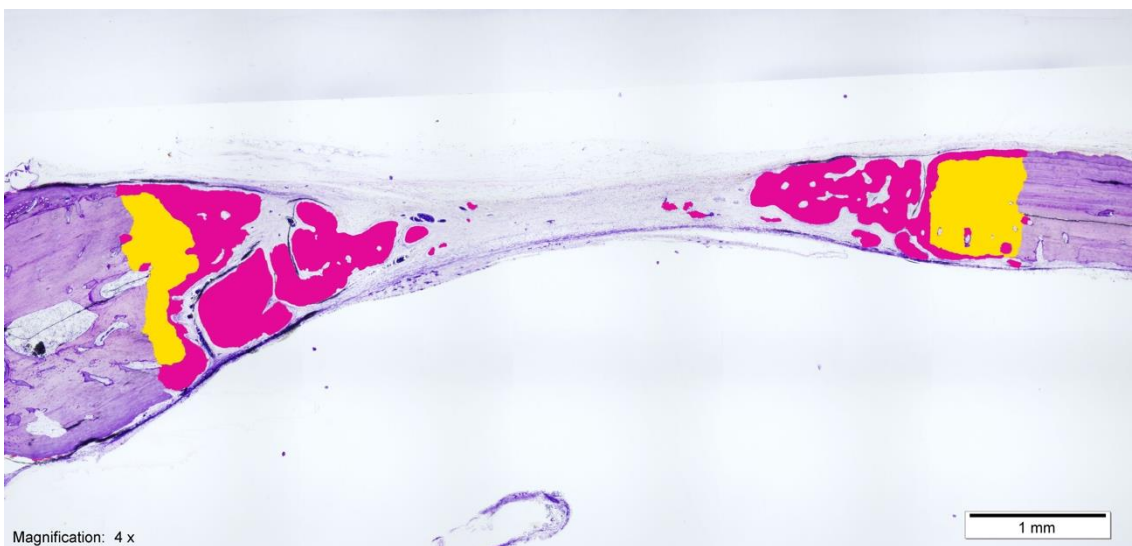
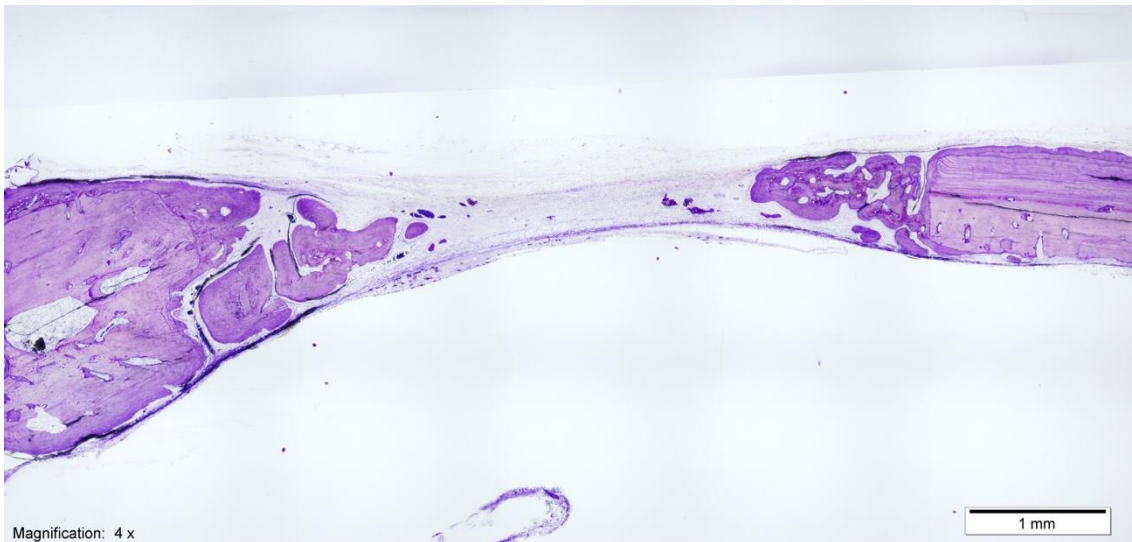


Figura 21. Muestras del defecto control de la rata 8L a las 8 semanas. Superior: La tinción de Levai-Laczkó es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. Inferior: Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo) se colorearon Magnificación  $\times 4$ .

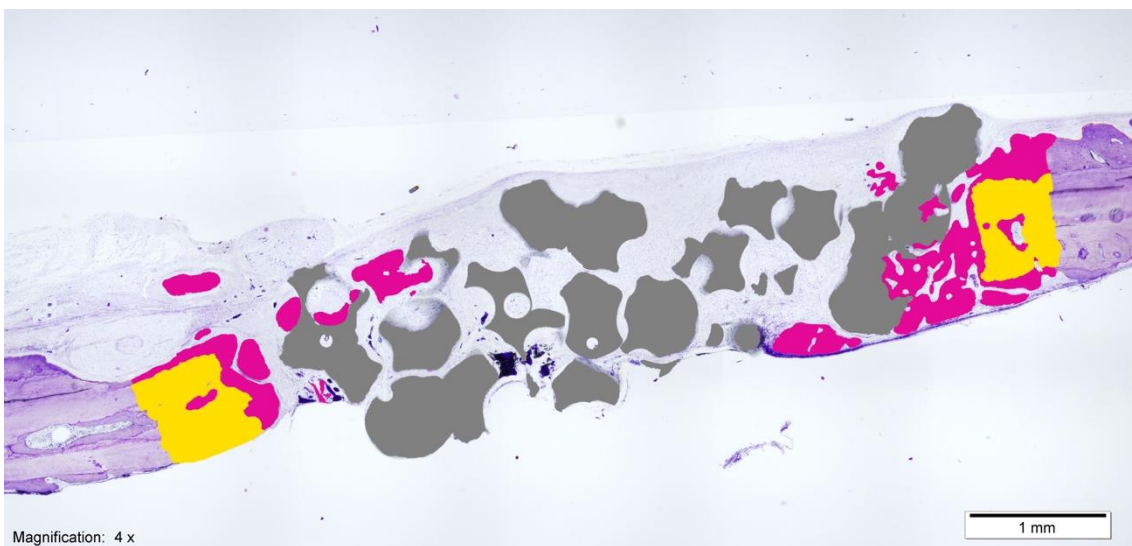
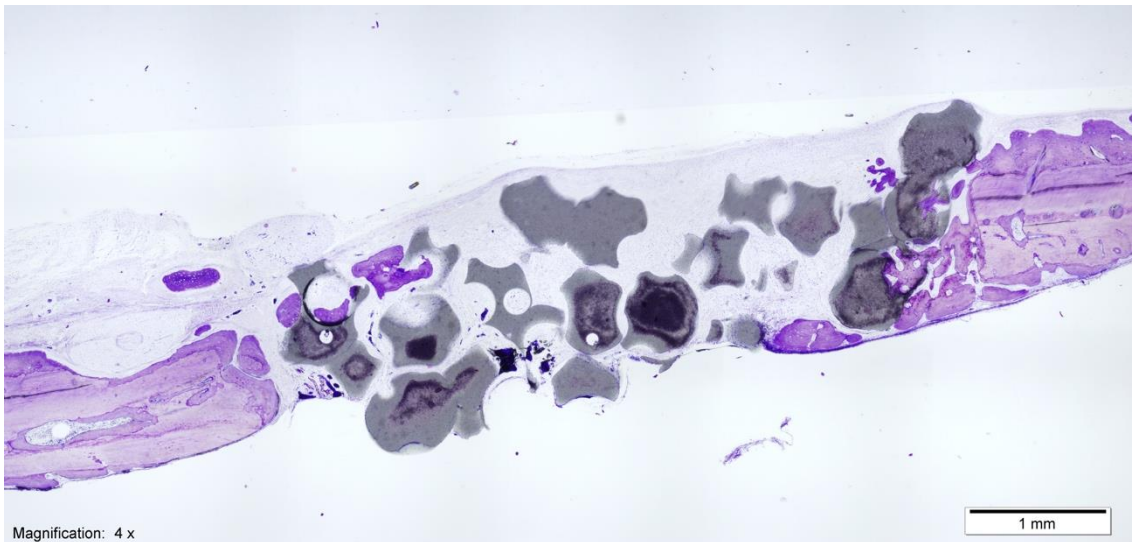


Figura 22. Muestras defecto relleno con TPC de la rata 8L a las 8 semanas. Superior: La tinción de Leiva-Laczkó es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. Inferior: El sustituto óseo se muestra en gris. Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo) y BS se colorearon. Magnificación  $\times 4$ .

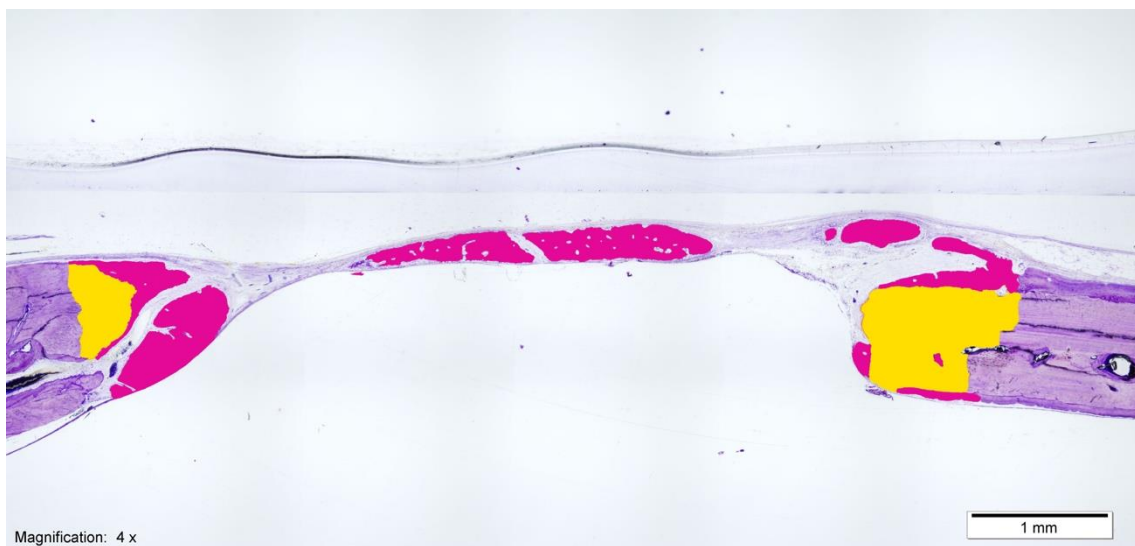
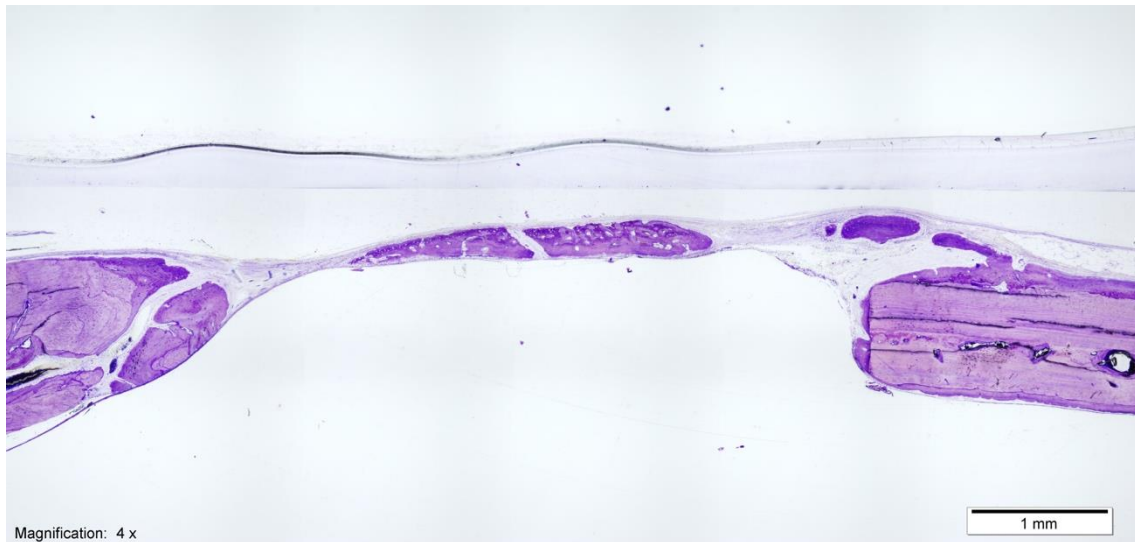


Figura 23. Muestras defecto control de la rata 21L a las 6 semanas. Superior: La tinción de Levai-Laczkó es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. Inferior: Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo) se colorearon. Magnificación  $\times 4$ .

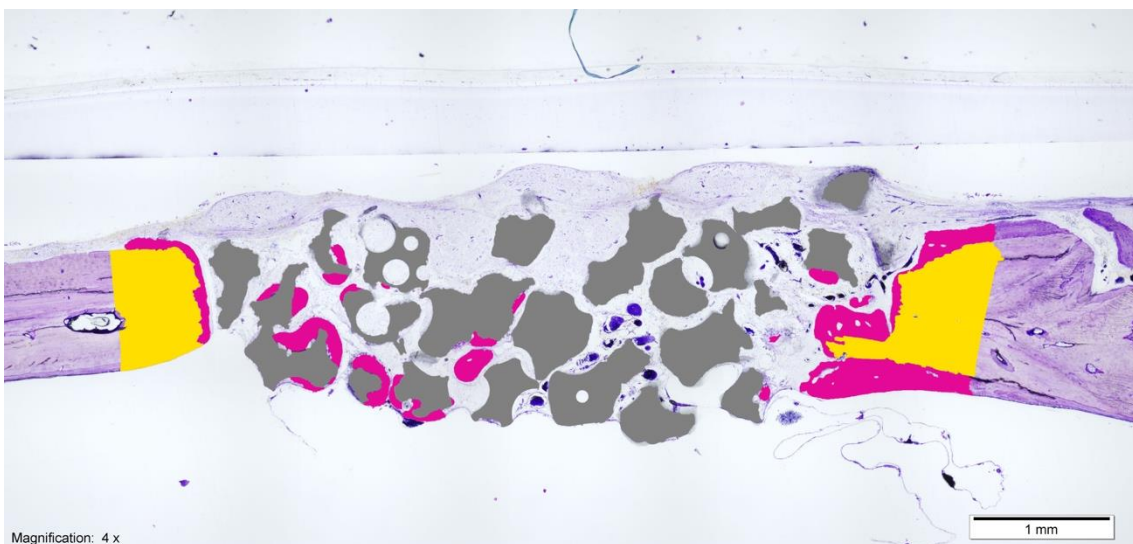
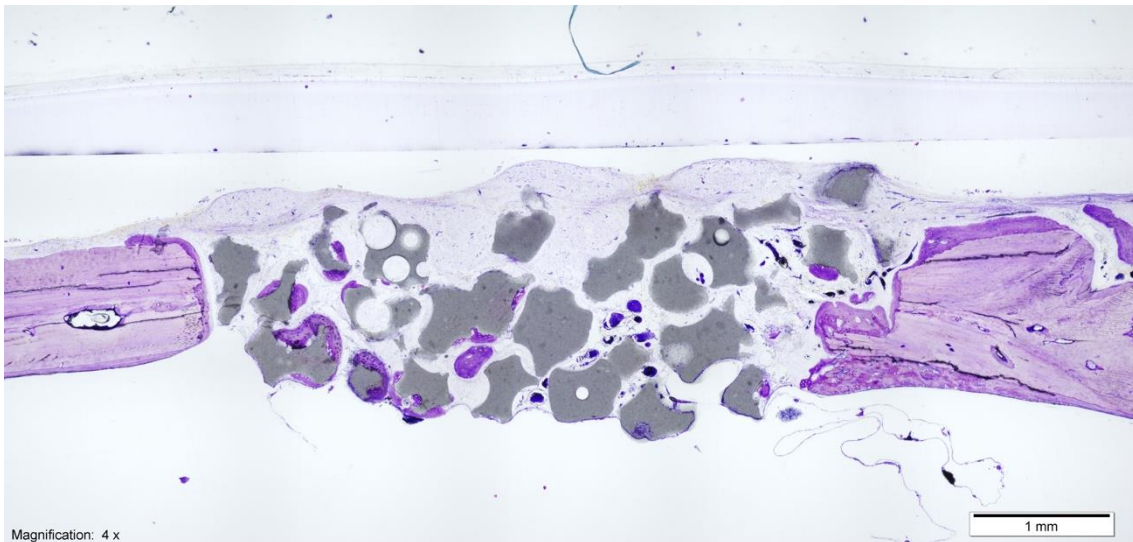


Figura 24. Muestras del defecto rellenado con TPC-Fn de la rata 21 D a las 6 semanas. Superior: La tinción de Levai-Laczkó es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. Inferior: El sustituto óseo se muestra en gris. Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo) y BS se colorearon. Magnificación  $\times 4$ .

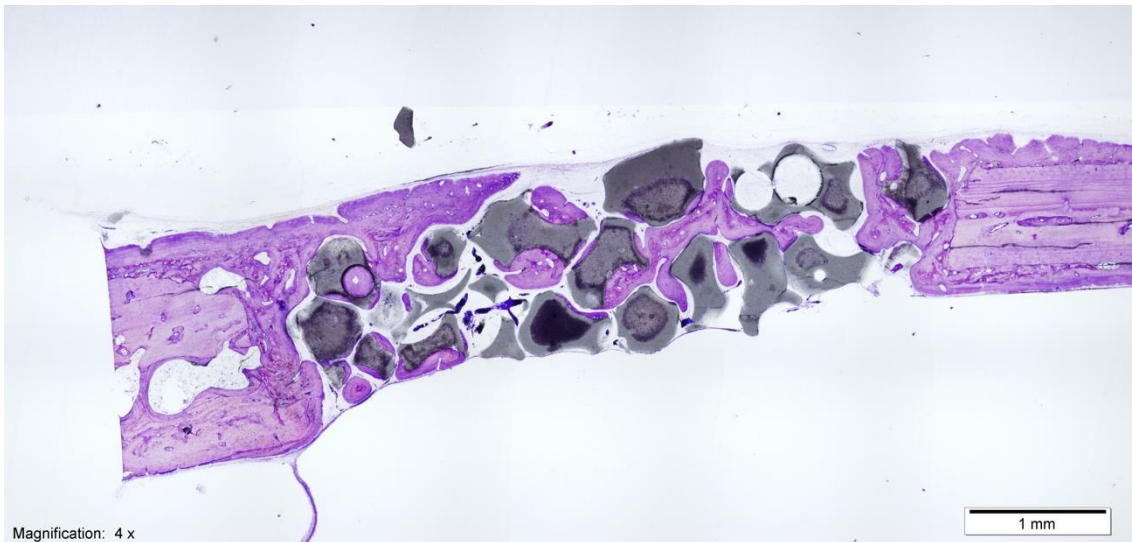


Figura 25. Muestras defecto relleno con TPC-Fn de la rata 6L a las 8 semanas. Superior: La tinción de Levai-Laczkó es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. Inferior: El sustituto óseo se muestra en gris. Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo) y BS se colorearon. Magnificación  $\times 4$ .

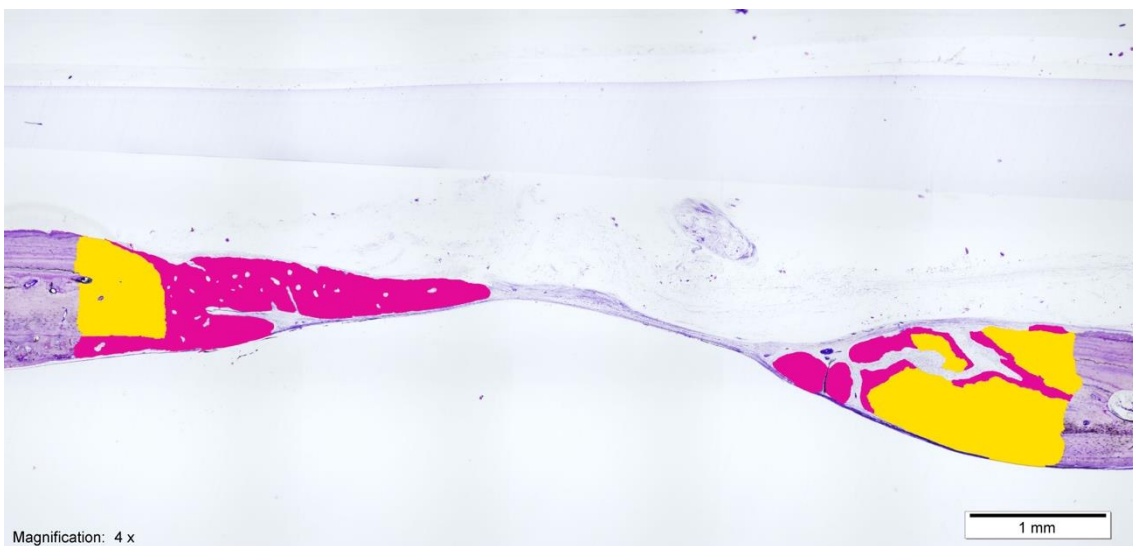
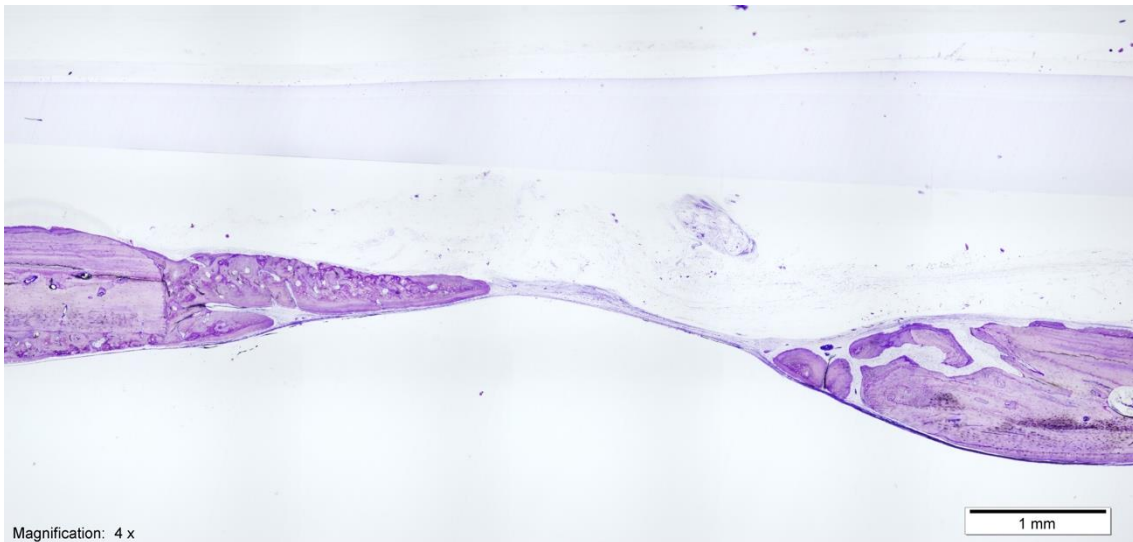


Figura 26. Muestras al defecto control de la rata 6D a las 8 semanas. Superior: La tinción de Levai-Laczko es capaz de diferenciar el hueso mineralizado nuevo y antiguo. El hueso mineralizado nuevo aparece en azul violeta intenso, y el hueso mineralizado viejo en los bordes del defecto se puede ver con un tono más pálido. Inferior: Usando un bolígrafo digital, las proporciones ocupadas por la MBM (rodamina rojo) se colorearon. Magnificación  $\times 4$ .



## **Capítulo 6. DISCUSIÓN**





En este estudio experimental efectuado en un modelo validado de defecto de tamaño crítico en la calota craneal de rata se ha examinado el potencial de regeneración ósea de una matriz de  $\beta$ -TCP, con el propósito de investigar si la adición de Fn mejoraba las propiedades de neoformación ósea, y con ello determinar el interés de la aplicabilidad clínica de este material.

Con respecto al objetivo principal del estudio, la adición de Fn al material de injerto de  $\beta$ -TCP ha demostrado ser eficaz para mejorar la regeneración ósea en los defectos de tamaño crítico en el modelo experimental de calota craneal de rata, en comparación con los defectos no tratados que formaban el grupo control. Sin embargo, en este estudio no se hallaron diferencias significativas frente a la matriz de  $\beta$ -TCP sin Fn, ya que el porcentaje de AA en el área diana, tanto expresado como porcentaje como en valor absoluto en  $\text{mm}^2$ , era similar.

No obstante, en el grupo de  $\beta$ -TCP-Fn, el porcentaje de GT, definido como la suma de MBM y BS, mostraba un aumento significativo en el área diana a lo largo del estudio, en tanto que en el grupo de  $\beta$ -TCP sin Fn parecía estabilizarse a las 6 semanas, sin que se detectara ningún aumento significativo posterior.

En referencia a los objetivos secundarios, el estudio demuestra que la MBM expresada en  $\text{mm}^2$ , a las 8 semanas era significativamente más favorable en el grupo de la matriz de  $\beta$ -TCP con Fn frente a la matriz sin Fn. Los cambios en la regeneración ósea según los biomateriales utilizados para el relleno de los defectos y el tiempo de exposición, también indican un efecto más favorable para la matriz con Fn, ya que el porcentaje de MBM en el

área diana continuaba aumentando de la semana 6 a la semana 8 hasta doblar su cifra mientras que la matriz sin fibronectina mantenía prácticamente el mismo valor.

En un estudio previo de regeneración ósea en un modelo canino en el que se comparaban  $\beta$ -TCP,  $\beta$ -TCP-Fn y  $\beta$ -TCP-Fn-ADSCs en dehiscencias del hueso alveolar, solo los defectos tratados con  $\beta$ -TCP-Fn-ADSCs mostraron un aumento significativo del área de regeneración ósea cuando los animales fueron sacrificados a los 3 meses en comparación con los sacrificados al cabo de 1 mes (Alvira-González et al., 2016). Los autores interpretan este resultado sugiriendo que el uso de una matriz de  $\beta$ -TCP recubierta por una combinación de Fn y ADSCs puede favorecer la estabilización del área regenerada, permitiendo el mantenimiento más eficiente del espacio a los 3 meses del proceso de cicatrización.

El injerto de hueso autólogo continúa siendo el patrón oro en los procesos de regeneración ósea hasta que no se descubra un biomaterial con las mismas propiedades de osteoinducción, osteoconducción, biocompatibilidad y seguridad (Guskuma et al., 2010). Sin embargo, la estabilidad del volumen injertado de hueso autólogo puede verse comprometida por la alta tasa de reabsorción. En un estudio prospectivo y aleatorizado de 55 pacientes con lesiones óseas benignas tratadas mediante curetaje, el relleno de los defectos con  $\beta$ -TCP ultraporoso (n = 26) o  $\beta$ -TCP con aspirado medular (n = 29) y seguidos durante una media de 18 meses, la adición de aspirado medular no aceleraba la neoformación ósea (Damron et al., 2013). En otro estudio prospectivo aleatorizado de 95 pacientes con quistes óseos solitarios tratados con  $\beta$ -TCP o aloinjerto óseo, tras una media de seguimiento de 28 meses, el análisis semicuantitativo radiográfico demostró

tasas comparables de degradación del material (Wang et al., 2013). En el presente estudio, la combinación de  $\beta$ -TCP con Fn parecía ser más ventajosa que la aplicación de  $\beta$ -TCP sola, pero con diferencias significativas únicamente en la variable MBM y GT a las 8 semanas.

La microporosidad, cristalinidad y tamaño de las partículas de  $\beta$ -TCP parecen ser características esenciales para proporcionar la estructura óptima para el crecimiento vascular y la formación de hueso. La microporosidad (tamaño del poro  $< 10 \mu\text{m}$ ) aumenta la adhesión a nivel macromolecular y favorece la penetración de fluidos, aunque el material ultraporoso de  $\beta$ -TCP ( $> 100 \mu\text{m}$ ) también soporta la neoformación ósea, creando un puente entre los bordes óseos y facilitando el crecimiento en el seno de defectos de tamaño crítico en tibias de rata (Calvo-Guirado et al., 2012). Por otra parte, la reducción del tamaño de los gránulos de  $\beta$ -TCP a nanómetros también puede contribuir a inducir una mayor porosidad y mayores superficies específicas, determinando una mejora del efecto regenerativo (Lee et al., 2016b). En un estudio de defectos óseos en un modelo de cerdo en el que se comparaban tres biomateriales de  $\beta$ -TCP, se concluye que el tamaño óptimo de las partículas de los gránulos debe ser entre  $160\text{-}300 \mu\text{m}$  o incluso menor (Damlar et al., 2015). En el presente estudio, el tamaño de KeraOs<sup>®</sup> era inferior ( $100\text{-}250 \mu\text{m}$ ), de modo que en estudios futuros sería de interés investigar el comportamiento de biomateriales de  $\beta$ -TCP con un tamaño de las partículas aún menor.

Asimismo, se han investigado compuestos de  $\beta$ -TCP con cristales de fosfato cálcico y polietileno de alta densidad para aumentar la proliferación y adhesión de las células osteoblásticas y fibroblásticas (Homaeigohar et al., 2005, 2008; Cai et al., 2009). Con la

utilización de cerámicas de  $\beta$ -silicato de calcio poroso en comparación con  $\beta$ -TCP, implantadas en defectos óseos de la calota craneal del conejo, se observó una mayor cantidad de hueso neoforado con  $\beta$ -silicato de calcio que con  $\beta$ -TCP (Xu et al., 2008). Sin embargo, ningún estudio previo ha comparado los sustratos de  $\beta$ -silicato de calcio y  $\beta$ -TCP en combinación con Fn.

La Fn se ha empleado para estimular la mineralización y la adhesión celular de matrices de  $\beta$ -TCP con resultados dispares respecto a la inducción de la diferenciación precoz de los osteoblastos. En un estudio del uso de Fn combinado con la enzima transglutaminasa sobre matrices de  $\beta$ -TCP, en las muestras tratadas solamente con Fn se observaron numerosas áreas de mineralización de pequeño tamaño mientras que en las tratadas con Fn y transglutaminasa, se observaron múltiples áreas de mineralización de mayor tamaño (Ball et al., 2009). Los autores de este trabajo concluyen recomendando el uso combinado de Fn y transglutaminasa para estimular la diferenciación osteoblástica en matrices de  $\beta$ -TCP. En matrices tridimensionales multicapa de quitosano-HA, el enriquecimiento con 25 ó 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Fn determinó un aumento de la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (Fernández et al., 2012).

En una línea celular ST2 derivada de la médula ósea de ratón, el tratamiento con un oligopéptido derivado de la Fn estimulaba la diferenciación osteoblástica, postulándose su mecanismo de acción a través de una vía de señalización celular similar a la mediada por BMP-2 (Cho et al., 2017). Los resultados de estas investigaciones confirman la utilidad de la Fn como biomaterial adicional para estimular la neoformación ósea. En el presente trabajo, se utilizó una concentración fija de Fn de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual no permite establecer comparaciones con otros estudios, pero la superioridad de la matriz de  $\beta$ -TCP asociada a

En apunta en esta dirección.

Otros intentos para mejorar la regeneración ósea en matrices de  $\beta$ -TCP incluyen la combinación con simvastatina, factores de crecimiento o células madre de pulpa dental. La simvastatina es un inhibidor de la síntesis de colesterol que estimula la expresión de BMP-2 en los osteoblastos. En un modelo de defectos de tamaño crítico de 5 mm en el cráneo de rata, se evaluó la osteoconductividad de diferentes materiales sustitutivos de hueso,  $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP y HA con y sin simvastatina a una dosis de 0,1 mg (Rojbani et al., 2011). Los animales fueron sacrificados a las 6 y 8 semanas y la cantidad de hueso neoformado se determinó mediante microtomografía computarizada (CT) y estudio histológico e histomorfométrico. La regeneración ósea fue superior en los grupos de TCP que en los de HA y controles, pero la  $\alpha$ -TCP presentaba una tasa de degradación elevada. En todos los grupos de  $\beta$ -TCP y HA en combinación con la simvastatina, la estimulación de la formación ósea era superior que los grupos controles o sin simvastatina (Rojbani et al., 2011).

En otro estudio en el modelo de defecto de tamaño crítico en la calota de rata, la combinación de simvastatina con fosfato cálcico bifásico (BoneCeramic®) también era más efectiva en la cantidad de hueso neoformado en comparación con la no adición de simvastatina y el grupo control (Macedo de Santana et al., 2016). BoneCeramic® es un material sintético de fosfato cálcico bifásico compuesto de un 60% de HA y un 40% de  $\beta$ -TCP. También se han obtenido resultados alentadores con la combinación de simvastatina 0,1 mg con  $\alpha$ -TCP (Nyan et al., 2009) o con la combinación de  $\alpha$ -TCP con la catequina del té verde (EGCG) (Rodríguez et al., 2011).

Respecto a las combinaciones de  $\beta$ -TCP con factores de crecimiento (Li et al., 2011; Cochran et al., 2016) y células madre de pulpa dental (Annibali et al., 2013, 2014), los resultados obtenidos son poco concluyentes. Por otra parte, el uso de BMP-2 parece no modificar sustancialmente las propiedades osteoconductoras de otros biomateriales injertados (cemento de fosfato cálcico y gel de ácido poliláctico y poliglicólico) en comparación con  $\beta$ -TCP solo (Luvizuto et al., 2011). En un estudio de la regeneración ósea de defectos de la calota craneal en conejos blancos New Zealand, el relleno de los defectos con matriz ósea desmineralizada lograba el cierre completo del defecto a las 12 semanas a diferencia de otros biomateriales, como cementos de fosfato cálcico o sulfato cálcico, en los que la evidencia de neoformación ósea era menor (Clokiet al., 2002). En el mismo modelo animal y usando matriz ósea desmineralizada, también se obtuvieron resultados similares, por lo que los autores sugieren el uso de este material para mejorar la protección del contenido intracraneal tras procedimientos de cirugía cráneo-facial (Haddad et al., 2006).

El uso de una membrana de colágeno bovino nativo para cubrir los defectos de tamaño crítico ha sido, sin duda, beneficioso para proteger el área de regeneración ósea de la invasión del tejido blando en una fase temprana del proceso regenerativo y, por tanto, proporcionando el tiempo suficiente para el relleno del defecto por el tejido óseo neoformado (Donos et al., 2015). En nuestro estudio, el uso de una membrana de barrera no influyó en el comportamiento de los defectos que se dejaron vacíos, permitiendo que actuaran como controles negativos efectivos.

Los resultados del presente estudio deben interpretarse teniendo en cuenta algunas

limitaciones. Es posible que existiera una causa potencial de sesgo en la obtención de las muestras microscópicas debido a diferencias entre los animales respecto al tamaño y grosor de la calota craneal o a imprecisiones en el eje del corte histológico. Esta desventaja se corrigió expresando los resultados de las variables histomorfométricas además de en  $\text{mm}^2$ , como porcentaje del área diana. El número de animales se calculó para obtener el mínimo tamaño muestral necesario, de modo que los animales no pudieron ser reemplazados o su número reducido aún más. Por esta razón, las medidas de las variables aumentan su fiabilidad cuando los resultados se expresan en porcentajes. Con respecto a la bilateralidad de la intervención, creando defectos de tamaño crítico de 5 mm y sirviendo uno de ellos como control, ya se ha descrito que esta estrategia es adecuada para obtener datos relevantes (Vajgel et al., 2014). Aunque este diseño permite disminuir el sesgo de selección al disponer de los defectos óseos asignados a los grupos de intervención y control en el mismo animal, existe un riesgo de contaminación. En nuestro caso tuvimos una muestra contaminada en el grupo de  $\beta$ -TCP a las 6 semanas, dos muestras en el grupo de  $\beta$ -TCP-Fn a las 6 semanas, además de una muestra no contaminada con cicatrización completa en el grupo  $\beta$ -TCP-Fn a las 8 semanas.

Por último, aunque ninguna especie cumpliría todos los requerimientos de un modelo experimental ideal, los roedores son una de las mejores opciones por la facilidad de disposición y manejo. Asimismo, un gran número de estudios de regeneración ósea en defectos de tamaño crítico publicados en la literatura se han efectuado en modelos de rata. Además, el modelo de la calota craneal de rata permite establecer defectos de tamaño crítico estandarizados y reproducibles.





## **Capítulo 7. CONCLUSIONES**



- El uso de  $\beta$ -TCP recubierto con Fn ( $\beta$ -TCP-Fn) mostró un efecto no significativo y levemente más efectivo que el  $\beta$ -TCP sin Fn respecto al incremento del volumen de hueso regenerado en los defectos de tamaño crítico de calota de rata como modelo experimental, posiblemente permitiendo un proceso más eficiente de remodelado (mayor ganancia de tejido y mayor mineralización del tejido ganado a igualdad de tiempo).
- Ambos biomateriales  $\beta$ -TCP con y sin Fn suponen una ventaja en comparación con los defectos óseos control (vacíos) en términos de mantenimiento del volumen óseo, evitando la invasión de tejido blando en el espacio de tejido duro y acelerando el nuevo proceso de formación ósea.
- No se encontraron diferencias claras entre  $\beta$ TCP y  $\beta$ TCP-Fn. Se necesitan estudios adicionales en que se extienda el período de seguimiento a más de 8 semanas o en períodos más cortos de 6 semanas para evaluar la capacidad osteogénica de  $\beta$ -TCP-Fn en la reconstrucción de defectos de calota de rata de tamaño crítico, así como estudiar la razón de crecimiento óseo de los defectos tratados mediante microscopio de fluorescencia.



## **Capítulo 8. BIBLIOGRAFÍA**



En esta Tesis se sigue el sistema de citación nombre-año (o sistema Harvard). En el texto, cada cita bibliográfica se identifica por el(los) apellido(s) de(los) firmante(s) y año de publicación. En la bibliografía, el estilo de las referencias sigue las recomendaciones del Comité Internacional de Editores de Revistas Biomédicas (*International Committee of Medical Journal Editors*, ICMJ, <http://www.icmej.org>), incluyéndose el nombre de todos los autores, los dígitos de la última página y la ubicación URL o el identificador de objeto digital (*Digital Object Identifier*, DOI, <http://www.doi.org>) para las publicaciones electrónicas. La exactitud de todas las referencias bibliográfica se ha comprobado con el artículo original o con su registro en la base de datos MEDLINE/PubMed.

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994;55(3):287-299.

Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;65:20-31.

Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W: Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig* 2000;4(4):219-225.

Alvira-González J, Sánchez-Garcés MÀ, Cairó JR, Del Pozo MR, Sánchez CM, Gay-Escoda C. Assessment of bone regeneration using adipose-derived stem cells in critical-size alveolar ridge defects: an experimental study in a dog model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2016;31(1):196-203.

Annibali S, Bellavia D, Ottolenghi L, Cicconetti A, Cristalli MP, Quaranta R, Pilloni A. Micro-CT and PET analysis of bone regeneration induced by biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp stem cells in a rat model of calvarial "critical size" defect: preliminary data. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014;102(4):815-825.



- Annibaldi S, Cicconetti A, Cristalli MP, Giordano G, Trisi P, Pilloni A, Ottolenghi L. A comparative morphometric analysis of biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp and periosteal stem cells in a model of bone regeneration. *J Craniofac Surg* 2013;24(3):866-871.
- Ball MD, O'Connor D, Pandit A. Use of tissue transglutaminase and fibronectin to influence osteoblast responses to tricalcium phosphate scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20(1):113-122.
- Barber FA, Spenciner DB, Bhattacharyya S, Miller LE. Biocomposite implants composed of poly(lactide-co-glycolide)/ $\beta$ -tricalcium phosphate: systematic review of imaging, complication, and performance outcomes. *Arthroscopy* 2017;33(3):683-689.
- Bartee BK. The use of high-density polytetrafluoroethylene membrane to treat osseous defects: clinical reports. *Implant Dent* 1995;41(1):21-26.
- Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 2014;94(1):25-34.
- Bellucci D, Sola A, Cannillo V. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: state of the art and current applications. *J Biomed Mater Res A* 2016;104(4):1030-1056.
- Beltrán V, Engelke W, Prieto R, Valdivia-Gandur I, Navarro P, Manzanares MC, Borie E, Fuentes R. Augmentation of intramembranous bone in rabbit calvaria using an occlusive barrier in combination with demineralized bone matrix (DBM): a pilot study. *Int J Surg* 2014;12(5):378-383.
- Benic GI, Thoma DS, Muñoz F, Sanz Martin I, Jung RE, Hämmerle CH. Guided bone regeneration of peri-implant defects with particulated and block xenogenic bone substitutes. *Clin Oral Implants Res* 2016;27(5):567-576.
- Borrasca AG, Aranega AM, Filho OM, Timóteo CA. Bone repair of surgical defects filled

with autogenous bone and covered with demineralized bone matrix membrane or polytetrafluoroethylene membrane in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30(2):442-449.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):139-146.

Bozec A, Zaiss MM. T Regulatory cells in bone remodelling. *Curr Osteoporos Rep* 2017;15(3):121-125.

Cai S, Xu GH, Yu XZ, Zhang WJ, Xiao ZY, Yao KD. Fabrication and biological characteristics of  $\beta$ -tricalcium phosphate porous ceramic scaffolds reinforced with calcium phosphate glass. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20(1):351-358.

Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Ramírez-Fernández MP, Maté-Sánchez JE, Ortiz-Ruiz A, Marcus A. Histomorphometric and mineral degradation study of Ossceram: a novel biphasic  $\beta$ -tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(6):667-675.

Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 2014;561:3-12.

Cho YD, Kim BS, Lee CS, Kim KH, Seol YJ, Lee YM, Rhyu IC, Ku Y, Ryoo HM. Fibronectin-derived oligopeptide stimulates osteoblast differentiation through a bone morphogenic protein 2-like signaling pathway. *J Periodontol* 2017;88(2):e42-e48.

Clokier CML, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GKB. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2002;13(1):111-121.

Cochran DL, Oh TJ, Mills MP, Clem DS, McClain PK, Schallhorn RA, McGuire MK6, Scheyer ET, Giannobile WV, Reddy MS, Abou-Arrej RV, Vassilopoulos PJ, Genco RJ, Geurs NC, Takemura A. A randomized clinical trial evaluating rh-FGF-2/ $\beta$ -TCP in periodontal

- defects. *J Dent Res* 2016;95(5):523-530.
- Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81(5):672-676.
- Damlar I, Erdoğan O, Tatli U, Arpağ OF, Görmez U. Comparison of osteoconductive properties of three different  $\beta$ -tricalcium phosphate graft materials: a pilot histomorphometric study in a pig model. *J Craniomaxillofac Surg* 2015;43(1):175-180.
- Damron TA, Lisle J, Craig T, Wade M, Silbert W, Cohen H. Ultraporous  $\beta$ -tricalcium phosphate alone or combined with bone marrow aspirate for benign cavitory lesions: comparison in a prospective randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* 2013;95(2):158-166.
- de Macedo NL, de Macedo LG, Monteiro Ado S. Calcium sulfate and PTFE nonporous barrier for regeneration of experimental bone defects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008 ;13(6):E375-9.
- Degidi M, Scarano A, Piattelli A. Regeneration of the alveolar crest using titanium micromesh with autologous bone and a resorbable membrane. *J Oral Implantol* 2003;29(2):86-90.
- Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Mineral Res* 2013;28(1):2-17.
- Development Core Team, R. F. F. S. C. (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Foundation for Statistical Computing, 2008, vol 1.
- <http://doi.org/10.1007/978-3-540-74686-7>.
- Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for

guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med* 2012;10:81. doi:10.1186/1741-7015-10-81.

Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11(4):318-326.

Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L. The effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(1):101-111.

Donos N, Dereka X, Mardas N. Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions. *Periodontol 2000* 2015;68(1):99-121.

Donos, N., Lang, N. P., Karoussis, I. K., Bosshardt, D., Tonetti, M., & Kostopoulos, L. The effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clinical Oral Implants Research*, 2004;15(1), 101–111. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.00986.x>

Fernández MS, Arias JI, Martínez MJ, Saenz L, Neira-Carrillo A, Yazdani-Pedram M, Arias JL. Evaluation of a multilayered chitosan-hydroxy-apatite porous composite enriched with fibronectin or an in vitro-generated bone-like extracellular matrix on proliferation and differentiation of osteoblasts. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;6(6):497-504.

Fernández-Tresguerres Hernández-Gil A, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: el proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(2):92-98.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*

2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746.

Fotek PD, Neiva RF, Wang HL. Comparison of dermal matrix and polytetrafluoroethylene membrane for socket bone augmentation: a clinical and histologic study. *J Periodontol* 2009;80(5):776-785.

Fu JH, Wang HL. Horizontal bone augmentation: the decision tree. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2011;31(4):429-436.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarian defects in the assessment of bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim* 2011;45(1):14-24.

Guskuma MH1 Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia Junior I, Okamoto R, Okamoto T, Magro Filho O. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. *J Appl Oral Sci* 2010;18(4):346-353.

Gutta R, Baker RA, Bartolucci AA, Louis PJ. Barrier membranes used for ridge augmentation: is there an optimal pore size? *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(6):1218-1225.

Haddad AJ, Peel SAF, Clokie CML, Sándor GKB. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2006;17(5):926-934.

Homaeigohar SSh, Shokrgozar MA, Sadi AY, Khavandi A, Javadpour J, Hosseinalipour M. *In vitro* evaluation of biocompatibility of beta-tricalcium phosphate-reinforced high-density polyethylene; an orthopedic composite. *J Biomed Mater Res* 2005;75(1):14-22.

Homaeigohar SSh, Shokrgozar MA, Khavandi A, Sadi AY. In vitro biological evaluation of beta-TCP/HDPE--A novel orthopedic composite: a survey using human osteoblast and

- fibroblast bone cells. *J Biomed Mater Res A* 2008;84(2):491-499.
- Huber E, Pobloth AM, Bormann N, Kolarczik N, Schmidt-Bleek K, Schell H, Schwabe P, Duda GN, Wildemann B. Demineralized bone matrix as a carrier for bone morphogenetic protein-2: burst release combined with long-term binding and osteoinductive activity evaluated in vitro and in vivo. *Tissue Eng Part A* 2017;23(23-24):1321-1330.
- Huh JB, Yang JJ, Choi KH, Bae JH, Lee JY, Kim SE, Shin SW. Effect of rhBMP-2 immobilized anorganic bovine bone matrix on bone regeneration. *Int J Mol Sci* 2015;16(7):16034-16052.
- Jensen SS, Brogгинi N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(3):237-243.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 2010;1(2):94-99.
- Kostopoulos L, Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects using bioresorbable polymer. *Clin Oral Implant Res* 1994;5(2):66-74.
- Laczko J, Levai G. A simple differential staining method for semi-thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin. *Mikroskopie* 1975;31:1-4.
- Lee IK, Lim HC, Lee JS, Hong JY, Choi SH, Jung UW. Layered approach with autogenous bone and bone substitute for ridge augmentation on implant dehiscence defects in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2016a;27(5):622-628.
- Lee DS, Pai Y, Chang S, Kim DH. Microstructure, physical properties, and bone

- regeneration effect of the nano-sized  $\beta$ -tricalcium phosphate granules. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016b;58(1):971-976.
- Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Djordjevic M, Kenney EB. The use of bovine porous bone mineral in combination with enamel matrix proteins or with an autologous fibrinogen/fibronectin system in the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol* 2001;72(9):1157-1163.
- Li J, Hong J, Zheng Q, Guo X, Lan S, Cui F, Pan H, Zou Z, Chen C. Repair of rat cranial bone defects with nHAC/PLLA and BMP-2-related peptide or rhBMP-2. *J Orthop Res* 2011;29(11):1745-1752.
- Li Z, Müller R, Ruffoni D. Bone remodeling and mechanobiology around implants: Insights from small animal imaging. *J Orthop Res* 2018;36(2):584-593.
- Liang F, Leland H, Jedrzejewski B, Auslander A, Maniskas S, Swanson J1, Urata M1, Hammoudeh J, Magee W 3rd. Alternatives to autologous bone graft in alveolar cleft reconstruction: the state of alveolar tissue engineering. *J Craniofac Surg* 2018;29(3):584-593.
- Lombardi G, Di Somma C, Rubino M, Faggiano A, Vuolo L, Guerra E, Contaldi P, Savastano S, Colao A. The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *J Endocrinol Invest* 2011;34 (Suppl):18-22.
- Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27(2):135-140.
- Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials* 2011;32(15):3855-3861.
- Macedo de Santana W, Nascimento de Sousa, Ferreira VM, Rodrigues Duarte W.

Simvastatin and biphasic calcium phosphate effects bone formation in critical-sized rat calvarial defects. *Acta Chir Bras* 2016;31(5):300-307.

Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron* 2005;37(7-8):630-644.

Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22(5):701-722.

Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):201-209.

Matsumoto G, Hoshino J, Kinoshita Y, Sugita Y, Kubo K, Maeda H, Ikada Y, Kinoshita Y. Alveolar bone regeneration using poly-(lactic acid-co-glycolic acid-co- $\epsilon$ -caprolactone) porous membrane with collagen sponge containing basic fibroblast growth factor: an experimental study in the dog. *J Biomater Appl* 2012;27(4):485-49.

Melsen F, Mosekilde L. Trabecular bone mineralization lag time determined by tetracycline double-labeling in normal and certain pathological conditions. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1980;88(2):83-88.

Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Weinreb M, Nemcovsky CE. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol* 2008;79(5):905-911.

Muñoz Corcuera M. Estudio de la aplicación clínica del beta-fosfato tricálcico en alveolos frescos postextracción humanos: estudio clínico e histológico. Tesis doctoral.

Universidad Complutense de Madrid, 2012. Disponible en:

<http://studylib.es/doc/6300456/estudio-de-la-aplicaci%C3%B3n-cl%C3%ADnica-del-beta> . Consultado el 22 de agosto, 2018.

Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of



- animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(1):123-145.
- Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(3):280-287.
- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982;9:257-65.
- Nyman S, Gottlow J, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation by guided tissue regeneration. *J Periodontal Res* 1987;22(3):252-254.
- O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90 Suppl 1:79-84.
- Park JM, Koak JY, Jang JH, Han CH, Kim SK, Heo SJ. Osseointegration of anodized titanium implants coated with fibroblast growth factor-fibronectin (FGF-FN) fusion protein. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(6):859-866.
- Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res* 2013;57(1):3-14.
- Rapuano BE, Hackshaw KM, Schniepp HC, MacDonald DE. Effects of coating a titanium alloy with fibronectin on the expression of osteoblast gene markers in the MC3T3 osteoprogenitor cell line. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012;27(5):1081-1090.
- Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(6):567-576.
- Reyes García R, Pozas Moreno P, Muñoz Torres M. Regulación del proceso de

- remodelado óseo. *Rev Esp Enferm Metab Oseas* 2008;17(1):10-14.
- Rh Owen G, Dard M, Larjava H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2017 Dec 20. doi: 10.1002/jbm.b.34049.
- Rivera-Chacon DM, Alvarado-Velez M, Acevedo-Morantes CY, Singh SP, Gultepe E, Nagesha D, Sridhar S, Ramirez-Vick JE. Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces. *J Biomed Nanotechnol* 2013;9(6):1092-1097.
- Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A* 2011;98(4):488-498.
- Rodriguez R, Kondo H, Nyman M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, Kasugai S. Implantation of green tea catechin  $\alpha$ -tricalcium phosphate combination enhances bone repair in rat skull defects. *Biomed Mater Res B Appl Biomater*.2011;98(2):263-271.
- Rothamel D, 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(3):369-378.
- Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent* 2017;3(1):23. doi: 10.1186/s40729-017-0084-4.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4(8):743-765.
- Sánchez-Garcés MÀ, Alvira-González J, Sánchez CM, Barbany Cairó JR, Del Pozo MR, Gay-

- Escoda C. Bone regeneration using adipose-derived stem cells with fibronectin in dehiscence-type defects associated with dental implants: an experimental study in a dog model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2017;32(2):e97-e106.
- Schilling T, Mueller M, Minne HW, Ziegler R. Mineral apposition rate in rat cortical bone: physiologic differences in different sites of the same tibia. *J Bone Mineral Res* 1992;7 Suppl 2:S429-432.
- Sela J, Gross UM, Kohavi D, Shani J, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Primary mineralization at the surfaces of implants. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11(4):423-436.
- Suenaga H, Furukawa KS, Suzuki Y, Takato T, Ushida T. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *J Mater Sci Mater Med* 2015;26(11):254. doi: 10.1007/s10856-015-5591-3.
- Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Av Periodon Implantol* 2012;24(3):133-138.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150(3698):893-899.
- Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res* 2014;25(8):879-893.
- von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(3):343-354.
- Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence Int* 1996;27(6):401-408.
- Wang Z, Guo Z, Bai H, Li J, Li X, Chen G, Lu J. Clinical evaluation of  $\beta$ -TCP in the treatment

of lacunar bone defects: a prospective, randomized controlled study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2013;33(4):1894-1899.

Xu S, Lin K, Wang Z, Chang J, Wang L, Lu J, Ning C. Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials* 2008;29(17):2588-2596.

Zellin G, Linde A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials* 1996;17(7):695-702.

Zhang J, Xu Q, Huang C, Mo A, Li J, Zuo Y. Biological properties of an anti-bacterial membrane for guided bone regeneration: an experimental study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:321-327.



## **Capítulo 9. ANEXOS**



## Tablas de la base de datos

code	Defect diameter	Augmentation Area (mm2)	Mineralized tissue %	Mineralized tissue (mm2)	Bone substitute %	Bone substitute (mm2)	Non-mineralized tissue %	Non-mineralized tissue (mm2)
1L	4,88	4,64	48,92	2,26	0	0	51,08	2,38
1R	5,3	6,24	17,3	1,08	37,7	2,35	45	2,81
2L	2,95	2,38	65,01	1,55	0	0	34,99	0,83
2R	4,78	8,72	13,7	1,2	38,49	3,36	47,81	4,16
3L	5,28	4,45	24,74	1,11	0,64	0,03	74,62	3,31
3R	4,78	6,48	13,41	0,87	20,41	1,32	66,18	4,29
4L	4,88	3,97	44,2	1,76	0	0	55,8	2,21
4R	5,08	10,92	22,23	2,43	37,64	4,11	40,13	4,38
5L	4,95	6,54	17,34	1,13	6,3	0,41	76,36	5
5R	5,44	2,89	24,07	0,69	0	0	75,93	2,2
6L	5,18	7,39	33,53	2,48	36,53	2,7	29,94	2,21
6R	5,1	3,28	34,02	1,11	0	0	65,98	2,17
7L	4,5	7,67	13,43	1,03	0	0	86,57	6,64
7R	4,83	6,86	45,8	1,74	31,81	1,21	22,39	3,91
8L	5,41	5,37	31,51	1,69	0	0	68,49	3,68
8R	5,5	6,32	13,13	0,83	40,57	2,56	46,3	2,93
9L	5,02	5,24	48,54	2,55	0	0	51,46	2,69
9R	4,84	6,15	24,26	1,49	34,15	2,1	41,59	2,56
10L	4,82	4,64	26,18	1,21	23,14	1,07	50,68	2,36
10R	4,47	2,8	34,25	0,95	0	0	65,75	1,85
11L	4,96	5,22	39,1	2,04	19,13	1	41,77	2,18
11R	5,09	3,66	22,95	0,84	0	0	77,05	2,82
12L	5,03	4,57	39,98	1,82	29,59	1,35	30,43	1,4
12R	5,09	3,85	12,18	0,46	0	0	87,82	3,39
13L	5,12	4,68	3,51	0,16	0	0	96,49	4,52
13R	4,96	6,92	26,6	1,86	38,58	2,71	34,82	2,35
14L	3,69	4,4	44,36	1,95	0	0	55,64	2,45
14R	5,23	6,62	20,46	1,35	36,45	2,41	43,09	2,86
15L	5,08	4,6	43,78	2,01	0	0	56,22	2,59
15R	5,02	6,03	68,71	4,1	15,51	0,94	15,78	0,99
16L	5,02	6,07	21,95	1,33	18,06	1,1	59,99	3,64
16R	4,9	4,11	23,81	0,98	0	0	76,19	3,13
17L	5,29	5,12	15,8	0,8	32,23	1,65	51,97	2,67
17R	3,8	3,06	29,4	0,52	0	0	70,6	2,54
18L	4,45	5,1	50,87	1,81	0	0	49,13	3,29
18R	5,14	5,85	44,25	2,59	26,27	1,54	29,48	1,72
19L	5,07	4,94	3,64	0,18	13,73	0,68	82,63	4,08
19R	5,12	6,14	9,58	0,58	0	0	90,42	5,56



20L	5,03	6,32	10,87	0,69	26,29	1,66	62,84	3,97
20R	4,95	7,38	42,85	3,16	0	0	57,15	4,22
21L	5,25	5,82	17,71	1,03	0	0	82,29	4,79
21R	5,12	4,83	10,51	0,51	38,61	1,87	50,88	2,45
22L	5,05	6,86	18,09	1,24	33,34	2,29	48,57	3,33
22R	5,06	4,62	21,83	1,03	0	0	78,17	3,59
23L	4,96	6,35	19,33	1,23	28,01	1,78	52,66	3,34
23R	5,04	5,21	26,71	1,39	0	0	73,29	3,82
24L	5	3,9	1,01	0,07	40,92	2,78	58,07	1,05
24R	4,8	3,59	12,85	0,47	0	0	87,15	3,12
26L	4,8	4,56	21,64	0,98	0	0	78,36	3,58
26R	5,24	6,35	5,54	0,44	45,6	3,59	48,86	2,32
27L	5,06	5,85	32,95	1,93	0	0	67,05	3,92
27R	5,03	7,51	47,88	3,61	32,93	2,49	19,19	1,41
28L	5,08	5,69	21,46	1,22	35,7	1,2	42,84	3,27
28R	5,08	4,59	52,34	2,4	5,19	0,24	42,47	1,95
29L	5,1	6,84	12,97	0,89	20,93	1,43	66,1	4,52
29R	5,04	3,4	14,84	0,56	0	0	85,16	2,84
30L	5,07	4,13	12,94	0,53	47,84	1,98	39,22	1,62
30R	5,07	3,49	26,85	0,93	0	0	73,15	2,56

	Tissue area (TA)	Augmented area (AA) within Augmentation Area (mm2)	Relation Augmented Area / Augmentation Area %
1L	5,21	4,12	88,79
1R	9,4	6,24	100,00
2L	2,38	2,07	86,97
2R	9,43	8,16	93,58
3L	4,45	3,52	79,10
3R	6,43	5,42	83,64
4L	3,97	3,34	84,13
4R	15,2	10,92	100,00
5L	6,54	3,88	59,33
5R	2,89	1,25	43,25
6L	7,2	7,11	96,21
6R	1,65	1,65	50,30
7L	2,23	2,25	29,34
7R	6,87	6,86	100,00
8L	3,75	3,75	69,83
8R	8,44	6,28	99,37
9L	4,98	4,71	89,89

9R	7,18	6,14	99,84
10L	4,83	4,5	96,98
10R	2,69	2,47	88,21
11L	5,98	4,74	90,80
11R	2,39	2,38	65,03
12L	4,1	4,1	89,72
12R	1,84	1,84	47,79
13L	1,77	1,77	37,82
13R	7,05	6,92	100,00
14L	4,31	4,32	98,18
14R	6,85	6,2	93,66
15L	3,51	3,5	76,09
15R	6,95	6,03	100,00
16L	6,34	5,91	97,36
16R	2,16	2,16	52,55
17L	7,16	5,01	97,85
17R	2,47	1,73	56,54
18L	3,56	3,56	69,80
18R	5,36	5,36	91,62
19L	3,2	3,2	64,78
19R	2,73	2,73	44,46
20L	6,8	5,8	91,77
20R	4,64	4,63	62,74
21L	1,98	1,98	34,02
21R	7,49	4,83	100,00
22L	9,18	6,46	94,17
22R	1,58	1,58	34,20
23L	10,5	6,3	99,21
23R	2,86	2,86	54,89
24L	6,82	3,4	87,18
24R	1,68	1,68	46,80
26L	1,82	1,82	39,91
26R	7,89	5,27	82,99
27L	2,99	2,53	43,25
27R	8,79	7,51	100,00
28L	4,92	4,96	87,17
28R	3,57	3,57	77,78
29L	4,42	4,42	64,62
29R	1,94	1,94	57,06
30L	6,4	4,13	100,00
30R	1,78	1,78	51,00

	Mineralized tissue %	Mineralized tissue (mm2)	Bone substitute %	Bone substitute (mm2)	Non-mineralized tissue %	Non-mineralized tissue (mm2)	Perimeter graft in AA (mm)	Perimeter graft in contact with bone (mm)	Contact new bone to graft surface %	Contact non-min tissue to graft surface %
1L	57,16	2,98	0	0	42,84	1,14				
1R	17,3	1,08	37,7	2,35	45	2,81	34,77	4,53	13,03	86,97
2L	74,65	1,55	0	0	25,35	0,52				
2R	14,92	1,22	41,35	3,37	43,73	3,57	46,77	3,32	7,10	92,90
3L	31,03	1,09	0,81	0,03	68,16	2,4				
3R	16,02	0,86	24,32	1,32	59,66	3,24	17,51	0,78	4,45	95,55
4L	52,81	1,76	0	0	47,19	1,58				
5R	22,23	2,43	37,64	4,11	40,13	4,38	48,76	7,89	16,18	83,82
5L	28,69	1,11	10,57	0,41	60,74	2,36	9,99	1,44	14,41	85,59
5R	55,59	0,69	0	0	44,41	0,56				
6L	34,94	2,49	37,92	2,7	27,14	1,92	41,91	10,86	25,91	74,09
6R	67,02	1,11	0	0	32,98	0,54				
7L	42,14	0,95	0	0	57,86	1,3				
7R	45,8	1,74	31,81	1,21	22,39	3,91	18	6,39	35,50	64,50
8L	45,08	1,69	0	0	54,92	2,06				
8R	13,17	0,82	40,79	2,56	46,04	2,9	34,45	2,64	7,66	92,34
9L	53,34	2,52	0	0	46,66	2,19				
9R	24,38	1,49	34,37	2,11	41,25	2,54	36,39	14,32	39,35	60,65
10L	26,9	1,21	23,96	1,08	49,14	2,21	21,14	6,26	29,61	70,39
10R	38,26	0,95	0	0	61,74	1,52				
11L	42,72	2,03	21,08	1	36,2	1,71	19,4	7,06	36,39	63,61
11R	32,45	0,77	0	0	67,55	1,61				
12L	43,75	1,8	32,92	1,35	23,33	0,95	19	6,85	36,05	63,95
12R	25,47	0,47	0	0	74,53	1,37				
13L	8,76	0,15	0	0	91,24	1,62				
13R	26,6	1,84	38,62	1,63	34,78	3,45	35	11,14	31,83	68,17
14L	45,51	1,97	0	0	54,49	2,35				
14R	21,87	1,35	38,85	1,28	39,28	3,57	34,49	5,68	16,47	83,53
15L	57,76	2,02	0	0	42,24	1,48				
15R	68,71	4,14	15,51	0,94	15,78	0,95	15,14	5,11	33,75	66,25
16L	22,32	1,32	18,61	1,1	59,07	3,49	20,81	0,81	3,89	96,11
16R	45,54	0,98	0	0	54,46	1,18				
17L	16,15	0,81	33,12	1,66	50,73	2,54	32,12	2,66	8,28	91,72
17R	29,4	0,52	0	0	70,6	1,21				
18L	50,87	1,81	0	0	49,13	1,75				
18R	47,84	2,57	28,68	1,54	23,48	1,25	24,44	11,42	46,73	53,27
19L	5,38	0,18	21,22	0,68	73,4	2,34	11,62	0	0,00	100,00
19R	21,54	0,59	0	0	78,46	2,14				

20L	11,55	0,67	28,41	1,65	60,04	3,48	29,31	0,63	2,15	97,85
20R	68,36	3,16	0	0	31,64	1,47				
21L	51,02	1,01	0	0	48,98	0,97				
21R	10,51	0,51	38,61	1,87	50,88	2,45	31,4	2,08	6,62	93,38
22L	18,76	1,21	35,25	2,28	45,99	2,97	32,42	1,15	3,55	96,45
22R	64,07	1,01	0	0	35,93	0,57				
23L	19,47	1,23	28,12	1,77	52,41	3,3	26,22	1,48	5,64	94,36
23R	48,51	1,36	0	0	51,49	1,5				
24L	2,08	0,07	35,68	1,21	62,24	2,12	31,53	0	0,00	100,00
24R	18,7	0,54	0	0	81,3	1,14				
26L	53,74	0,98	0	0	46,26	0,84				
26R	7,92	0,42	47,31	2,49	44,77	2,36	34,7	4,12	11,87	88,13
27L	77,68	1,96	0	0	22,32	0,57				
27R	47,88	3,61	32,93	2,49	19,19	1,41	28,04	8,97	31,99	68,01
28L	24,46	1,21	40,68	2,02	34,86	1,73	39,04	7,09	18,16	81,84
28R	67,06	2,39	6,66	0,24	26,28	0,94				
29L	17,23	0,77	32,34	1,43	50,43	2,22	21,87	2,69	12,30	87,70
29R	32,88	0,64	0	0	67,12	1,3				
30L	12,94	0,53	47,84	1,98	39,22	1,62	27,48	1,86	6,77	93,23
30R	52,39	0,93	0	0	47,61	0,85				

## Estudio estadístico

### Informe Estadístic

Estudi:  
Regeneració òssia en animals

Servei d'Estadística Aplicada

11 de novembre de 2016



Servei d'Estadística  
Universitat Autònoma de Barcelona

---

## Informe Estadístic

Promotora:

Ma Angels Sánchez Garcés

Facultat d'Odontologia

Universitat Autònoma de Barcelona

Autor:

Servei d'Estadística Aplicada

Universitat Autònoma de Barcelona

e-mail: s.estadistica@uab.cat

Date:

11 de noviembre de 2016

## Àrees de responsabilitat i signatures dels investigadors

Declarem que el present informe estadístic corresponent a l'estudi "Regeneració òssia en animals" ha estat dut a terme segons els procediments descrits a continuació. A més, declarem és un fidel reflex dels resultats obtinguts.

Llorenç Badiella  
Director  
Servei d'Estadística Aplicada  
Universitat Autònoma de Barcelona  
e-mail: s.estadistica@uab.cat

## Índex

<b>1. Objectiu de l'estudi</b>	<b>5</b>
1.1. Disseny de l'estudi . . . . .	5
1.2. Inclusió de pacients . . . . .	5
<b>2. Variables i població analitzada</b>	<b>7</b>
2.1. Variables principals . . . . .	7
2.2. Variables explicatives . . . . .	7
2.3. Pacients analitzats . . . . .	7
<b>3. Mètodes estadístics</b>	<b>8</b>
3.1. Anàlisi estadístic . . . . .	8
3.2. Gestió de la base de dades . . . . .	8
3.3. Anàlisi de la variable resposta principal . . . . .	8
<b>4. Resultats</b>	<b>9</b>
4.1. Informació experimental de la mostra . . . . .	9
4.2. Quantitat de material. Modelització de <i>Augmented Area</i> (%) . . . . .	9
4.3. Qualitat del teixit . . . . .	11
4.3.1. Variable <i>mineralized tissue</i> (%) . . . . .	11
4.3.2. Variable <i>bone substitute</i> (%) . . . . .	13
4.3.3. Variable <i>mineralized tissue + bone substitute</i> (%) . . . . .	15
<b>5. Discussions</b>	<b>17</b>
5.1. Quantitat de teixit . . . . .	17
5.2. Qualitat del teixit . . . . .	17
5.2.1. Mineralized tissue . . . . .	17
5.2.2. Bone substitute . . . . .	18
5.2.3. Quality tissue . . . . .	18



## 1 Objectiu de l'estudi

### Objectiu de l'estudi

Avaluar l'eficàcia de diferents tractaments per a la regeneració òssia.

### 1.1 Disseny de l'estudi

Experimental, controlat amb assignació aleatòria i longitudinal (mesures a les 6 setmanes i a les 8 setmanes).

#### Emmascarament

No aplicable

#### Assignació aleatòria

Cada unitat experimental (animal) sotmès a dues intervencions: control i tractament.

#### Tractaments

Es consideren tres tractaments:

1. Beta fosfat tricalcic tractat (associat) amb fibronectina (B-TCP-Fn).
2. Beta fosfat tricalcic sense fibronectina (B-TCP).
3. Grup control

#### Fases de l'estudi

No aplicable

### 1.2 Inclusió de pacients

La mida de mostra de l'estudi es va fixar inicialment en 30 pacients. Cada pacient rebia una intervenció assignada al grup control i una altra intervenció assignada als grups A/B a l'atzar. Configurant un total de 60 mesures. Aquesta mida de mostra ofereix una potència del 80 % per a detectar diferències en termes de "effect size" de 1.1 std, al comparar mesures quantitatives entre grups tractats, i de 0.9 std al comparar cadascun dels grups tractats en front del grup control; emprant un t-test bilateral per a grups independents i fixant el nivell de significació al 5 %. La magnitud de diferències que es poden detectar al comparar grups tractats per al mateix període és de 1.5 std i de 1.3 std per a comparar cadascun dels grups tractats en front del grup control.

Donat que els mateixos animals reben les intervencions control i un dels tractaments, l'anàlisi mitjançant un model mixte incorporant el pacient com a bloc, permetrà detectar mides de l'efecte menors. Aquestes mesures de la magnitud de l'efecte que l'estudi podria detectar es consideren adients donada la naturalesa exploratòria del mateix.

La mida de mostra efectiva finalment fou de 29 pacients, doncs un ratolí va ser retirat a causa de XXX . A més, una de les observacions per a un dels ratolins sota el tractament B-TCP-Fn, es va eliminar donat que el desperfecte era molt irregular.

## 2 Variables i població analitzada

### 2.1 Variables principals

Les variables d'interès són:

- Defect Diameter (mm<sup>2</sup>)
- Augmentation Area (mm<sup>2</sup>)
- Augmented area (%)
- Mineralized tissue % i (mm<sup>2</sup>)
- Bone substitute % i (mm<sup>2</sup>)
- Non-mineralized tissue % i (mm<sup>2</sup>)

On en tot cas els percentatges fan referència a l'àrea de la variable en qüestió respecte a l'àrea de la cavitat o *augmentation area*.

### 2.2 Variables explicatives

Les variables explicatives considerades en l'estudi són:

- Treatment (B-TCP-Fn / B-TCP / Control)
- Side (Left / Right)
- Week (6 weeks / 8 weeks)

### 2.3 Pacients analitzats

No s'ha exclòs cap animal de l'estudi. S'han analitzat un total de **29** animals.

#### **Imputació de dades faltants**

No s'ha aplicat cap procés d'imputació de dades faltants.

## 3 Mètodes estadístics

### 3.1 Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic s'ha dut a terme mitjançant el software R v3.1.2.

S'ha fixat el nivell de significació per totes les proves estadístiques al 5 % ( $p < 0.05$ ). S'ha aplicat la correcció de Tukey per multiplicitat de contrastos.

Totes les bases de dades, codis i resultats de les anàlisis, han estat emmagatzemats i arxivats electrònicament.

### 3.2 Gestió de la base de dades

Tota la gestió de la base de dades s'ha realitzat mitjançant el software R v3.1.2.

### 3.3 Anàlisi de la variable resposta principal

La possible relació entre les variables resposta i les variables explicatives es va examinar principalment per mitjà de l'anàlisi bivariant. Es van aplicar els següents mètodes:

- Variables explicatives qualitatives: la prova apropiada per a la comparació de variables quantitatives entre els grups s'ha utilitzat les següents proves: Anàlisi de la variància, el test de Mann-Whitney-Wilcoxon o Kruskal-Wallis segons convingui. El compliment de les condicions d'aplicació de les proves s'ha realitzat mitjançant les proves de normalitat i Levene Shapiro-Wilk i de Kolmogorov-Smirnov per homogeneïtat de variàncies.

Per analitzar l'efecte de la setmana, tractament i la interacció entre les dues variables, s'ha realitzat un model lineal general amb mesures repetides (cada animal té dues mesures). S'ha completat aquest anàlisi mitjançant gràfics de les mitjanes estimades segons tractament i setmana. Per les variables estadísticament significatives es realitza la comparació entre els corresponents grups i es dona una estimació de les mitjanes per cada grup.

## 4 Resultats

### 4.1 Informació experimental de la mostra

En el present estudi es van seleccionar 29 animals i en tots ells es van dur a terme dues perforacions al crani (left/right). Dels 29 animals, 14 van ser sacrificats i mesurats a les 6 setmanes, mentre que la resta ho van ser a les 8. En total es disposa de 13 mesures per al tractament B-TCP-Fn, 16 pel tractament B-TCP i 28 controls.

L'individu 2 presentava un error de mesura en el diàmetre del defecte de la perforació esquerra, de manera que ha estat exclòs de l'estudi.

En aquest cas, la mitjana del diàmetre del defecte va ser de 4.98(0.31) mm mentre que la mitjana de l'àrea del defecte va ser de 4.82 (1,20) mm<sup>2</sup>.

Pel que fa a la homogeneïtat basal entre tractaments (homogeneïtat del material experimental respecte els grups de tractament), d'una banda s'ha trobat que la mitjana del diàmetre del defecte va ser de 5.05 mm pel grup control, de 5.08 mm pel grup B-TCP-Fn i de 4.98 mm pel grup B-TCP. A més, el no s'han trobat evidències per rebutjar la diferència entre mitjanes de grup ( $p = 0,37$ ), confirmant així la homogeneïtat basal.

### 4.2 Quantitat de material. Modelització de *Augmented Area* (%)

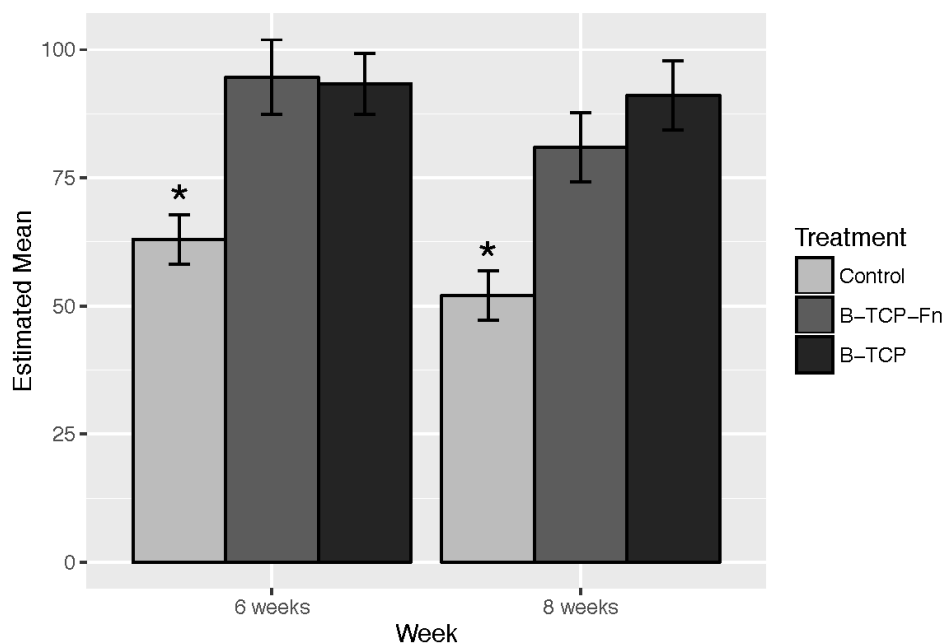
Amb el fi d'analitzar l'efecte de les variables tractament i setmana pel que fa a la quantitat de material que es crea en l'interior del defecte, prenem com a variable resposta la variable *Augmentation* (%). A continuació ajustem un model lineal prenent com a variables explicatives la variable tractament, la variable setmana i la interacció entre les dues anteriors. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 1.

	numDF	denDF	F-value	p-value
Intercept	1.000	27.000	116.556	<.001
Treatment	2.000	24.000	15.560	<.001
Week	1.000	27.000	2.568	0.121
Treatment*Week	2.000	24.000	0.449	0.643

**Taula 1:** Resultats de la significació de l'efecte de cada variable explicativa sobre la variable augmented area within augmentation area .

Segons els resultats que es mostren en la taula 1, la variable tractament té un efecte significatiu en la variació de la variable *augmented area* (%) ( $p < 0,001$ ). Per contra, la variable setmana no es significativa en el model.

A continuació, s'estimen les mitjanes per a cada un dels grups definits per les variables tractament i setmana. Els resultats es troben representats en la figura 1.



**Figura 1:** Estimacions de la mitjana de la variable *augmented area* (%) per a cada tractament i per a 6 i 8 setmanes. Les mitjanes que difereixen significativament d'alguna altra mitjana han estat etiquetades amb \*.

A continuació es realitzen els contrastos de comparació de mitjanes 2 a 2. Els resultats es troben a la taula 2.

	Contrast	Week	Estimate	SE	t.ratio	p.value
1	Control - B-TCP-Fn	6 weeks	-28.87	7.81	-3.69	<0.001
2	Control - B-TCP	6 weeks	-39.05	7.81	-5.00	<0.001
3	B-TCP-Fn - B-TCP	6 weeks	-10.18	9.50	-1.07	0.54
4	Control - B-TCP-Fn	8 weeks	-31.66	8.36	-3.79	<0.01
5	Control - B-TCP	8 weeks	-30.40	7.14	-4.26	<0.001
6	B-TCP-Fn - B-TCP	8 weeks	1.26	9.38	0.13	0.99

**Taula 2:** Resultats de les comparacions de mitjanes entre tractaments 2 a 2 per a cada setmana per a la variable *augmented area*.

De la taula 2 destaquem que hi ha diferències estadísticament significatives en les mitjanes de la variable *augmented area* (%) entre els tractaments B-TCP-Fn i B-TCP i el

grup control tant a les 6 com a les 8 setmanes ( $p < 0.001$  en tots els casos). No obstant, no han estat detectades diferències significatives en les mitjanes d'aquesta variable entre els tractaments B-TCP-Fn i B-TCP ni per a les 6 setmanes i per a les 8.

### 4.3 Qualitat del teixit

La qualitat del teixit que es produeix en la cavitat està mesurada per dues magnituds, la quantitat de *mineralized tissue* i la quantitat de *bone substitute*. L'efecte de les variables explicatives en aquestes variables ha estat estudiat en dues seccions diferenciades.

#### 4.3.1. Variable *mineralized tissue*(%)

En aquesta secció es dur a terme una modelització de la variable *mineralized tissue*(%), prenent com a variables explicatives el tractament, la setmana i la interacció entre aquestes dues variables. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 3.

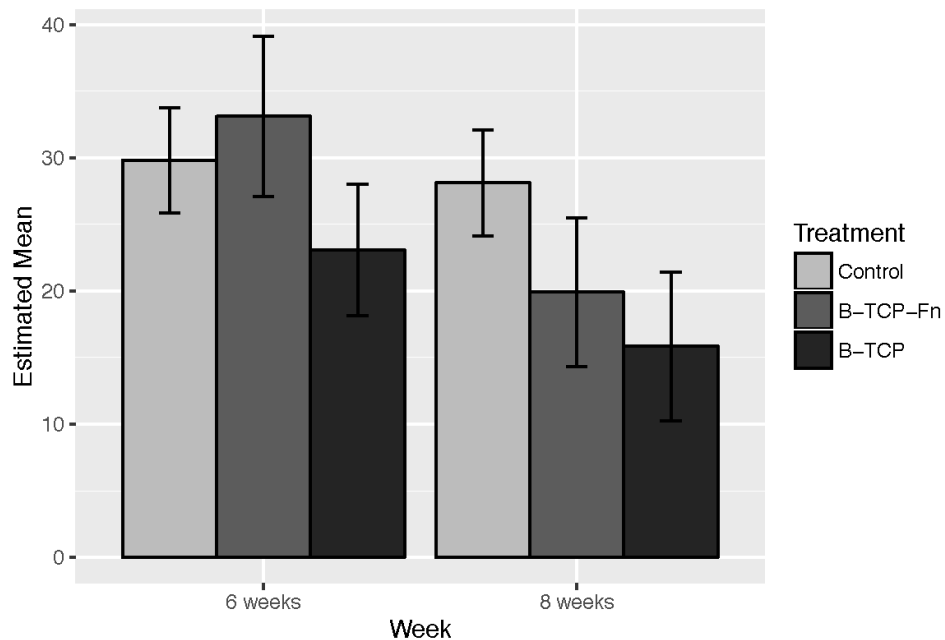
	numDF	denDF	F-value	p-value
Intercept	1.000	27.000	50.098	<.001
Treatment	2.000	24.000	2.083	0.146
Week	1.000	27.000	0.090	0.767
Treatment*Week	2.000	24.000	0.781	0.469

**Taula 3:** Resultats de la significació de l'efecte de cada variable explicativa sobre la variable *mineralized tissue*.

Segons els resultats que es mostren en la taula 3 ni el tractament ni la setmana tenen un efecte significatiu vers la variable *mineralized tissue* (%).

A continuació, s'estimen les mitjanes per a cada un dels grups definits per les variables tractament i setmana. Els resultats es troben representats en la figura 2.

Finalment es realitzen els contrastos de comparació de mitjanes 2 a 2. Els resultats es troben a la taula 4.



**Figura 2:** Estimacions de la mitjana de la variable *Mineralized tissue* (%) per a cada tractament i per a 6 i 8 setmanes.

Contrast	Week	Estimate	SE	t.ratio	p.value
Control - B-TCP-Fn	6 weeks	8.21	6.50	1.26	0.43
Control - B-TCP	6 weeks	12.26	6.50	1.89	0.16
B-TCP-Fn - B-TCP	6 weeks	4.05	7.86	0.52	0.86
Control - B-TCP-Fn	8 weeks	-3.31	6.94	-0.48	0.88
Control - B-TCP	8 weeks	6.70	5.95	1.13	0.51
B-TCP-Fn - B-TCP	8 weeks	10.01	7.76	1.29	0.41

**Taula 4:** Resultats de les comparacions de mitjanes entre tractaments 2 a 2 per a cada setmana per a la variable mineralized tissue.

De la taula 4 destaquem que en cap cas hi ha diferències estadísticament significatives entre les mitjanes de la variable *mineralized tissue* (%).



#### 4.3.2. Variable *bone substitute*(%)

En aquesta secció es dur a terme una modelització de la variable *bone substitute*(%), prenent com a variables explicatives el tractament, la setmana i la interacció entre aquestes dues variables. Els resultats obtinguts es mostren a la taula 5.

Cal destacar però, que la formació de substitut ossi és provocada exclusivament per l'aplicació d'un tractament, de manera que, aquesta variable pren el valor 0 en tot cas per aquells individus del grup control. Així doncs, el grup control és eliminat en aquesta part de l'estudi amb la fi d'estudiar les diferències entre tractaments de forma més neta.

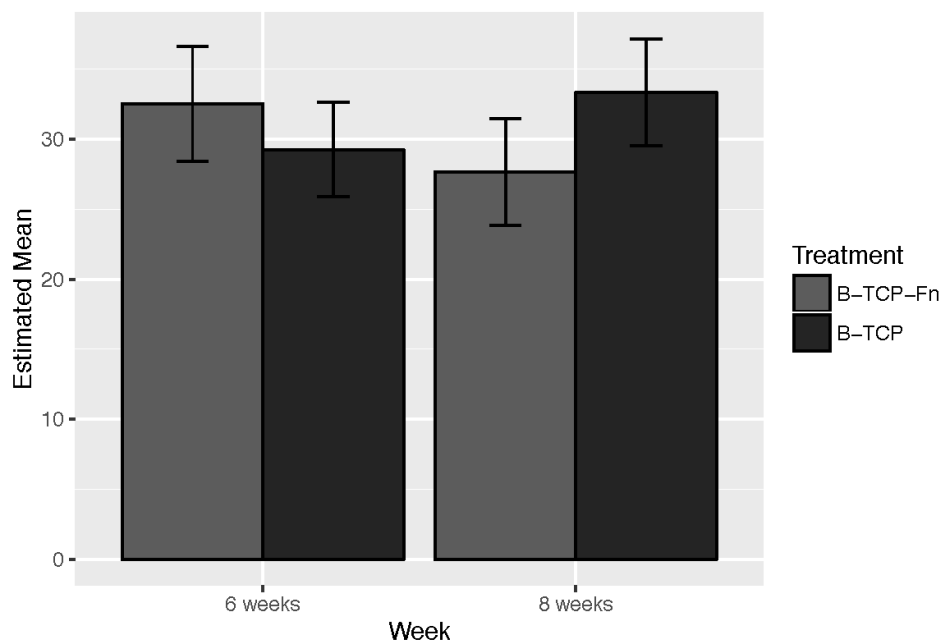
De manera similar a les seccions anteriors, ajustem un model lineal amb l'objectiu de detectar efectes significatius de les covariables en la variable resposta *bone substitute* (%). Prenem de nou com a variables explicatives el tractament, la setmana i la interacció entre aquest dos termes.

	numDF	denDF	F-value	p-value
Intercept	1.000	25.000	52.731	<.001
Treatment	1.000	25.000	1.119	0.3
Week	1.000	25.000	0.751	0.394
Treatment*Week	1.000	25.000	1.403	0.247

**Taula 5:** Resultats de la significació de l'efecte de cada variable explicativa sobre la variable *bone substitute*.

Segons els resultats que es mostren en la taula 5 cap de les variables considerades té un efecte significatiu en la variació de la variable *bone substitute*.

A continuació, s'han estimat les mitjanes per a cada un dels grups definits per les variables tractament i setmana. Els resultats es troben representats en la figura 3.



**Figura 3:** Estimacions de la mitjana de la variable *Bone Substitute* per a cada tractament i per a 6 i 8 setmanes.

Finalment es realitzen els contrastos de comparació de mitjanes 2 a 2. Els resultats es troben a la taula 6.

	Contrast	Week	Estimate	SE	t.ratio	p.value
1	B-TCP-Fn - B-TCP	6 weeks	-5.70	5.39	-1.06	0.30
2	B-TCP-Fn - B-TCP	8 weeks	3.26	5.31	0.61	0.54

**Taula 6:** Resultats de les comparacions de mitjanes entre tractaments 2 a 2 per a cada setmana per a la variable bone substitute.

De les taules 6 destaquem que, ni per a la setmana 6 ni per a la 8, hi ha diferències estadísticament significatives entre les mitjanes de la variable *Bone substitute* (%) pels diferents tractaments.

### 4.3.3. Variable *mineralized tissue + bone substitute* (%)

Degut a que en les seccions anterior no s'han detectat efectes significatius ni dels tractaments ni de les setmanes vers a la variació de la qualitat del material creat a la cavitat, plantegem un nou enfocament amb l'objectiu d'obtenir un model més sensible a la detecció de diferències que sigui capaç de trobar efectes significatius.

Aquest enfocament consisteix en considerar una nova variable resposta fruit de la suma de les variables *mineralized tissue* (%) i *bone substitute* (%). La idea es estudiar de forma més general l'efecte de les covariables vers a una mesura de qualitat que engloba les dues variables considerades en les seccions anteriors. Anomenem a aquesta nova variable *Quality tissue* (%). És a dir:

$$Quality\ tissue\ (\%) = mineralized\ tissue\ (\%) + bone\ substitute\ (\%)$$

De forma similar a les seccions anteriors, verifiquem la significació de l'efecte de les variables explicatives vers la variable resposta *Quality tissue* (%) ajustant un model lineal i, prenent com a covariables, el tractament, la setmana i la interacció entre aquests dos termes. Els resultats poden trobar-se a la taula 7.

	numDF	denDF	F-value	p-value
Intercept	1.000	27.000	47.200	<.001
Treatment	2.000	24.000	6.916	0.004
Week	1.000	27.000	0.057	0.814
Treatment*Week	2.000	24.000	1.456	0.253

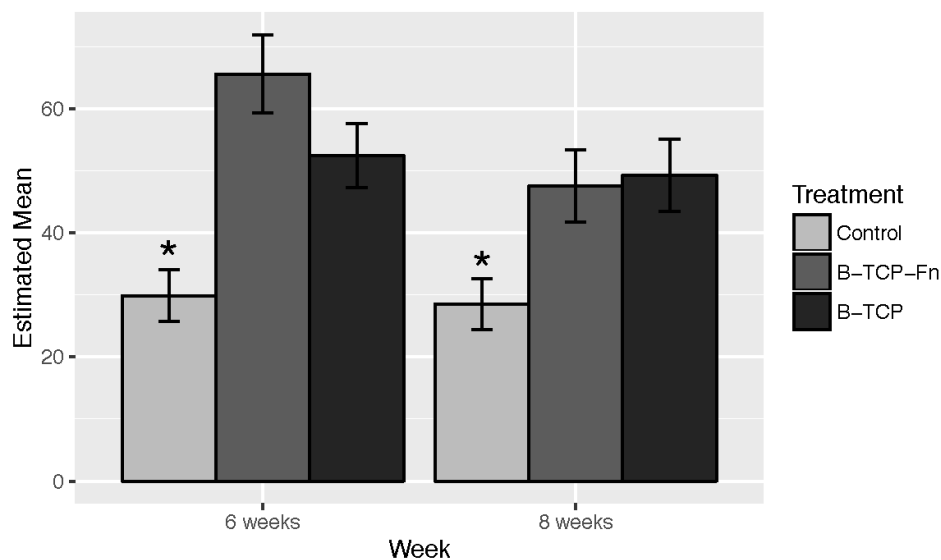
**Taula 7:** Resultats de la significació de l'efecte de cada variable explicativa sobre la variable *Quality tissue*.

Segons els resultats que es mostren en la taula 7, la variable tractament té un efecte significatiu en la variació de la variable *Quality tissue*(%) ( $p < 0,05$ ). Per contra, la variable setmana no es significativa en el model.

Aquesta nova variable resposta ha permès la detecció d'un efecte significatiu de la variable tractament vers a la qualitat del teixit format a la cavitat.

A continuació, s'han estimat les mitjanes per a cada un dels grups definits per les variables tractament i setmana. Els resultats es troben representats en la figura 3.

A continuació es realitzen els contrastos de comparació de mitjanes 2 a 2. Els resultats es troben a la taula 8.



**Figura 4:** Estimacions de la mitjana de la variable *Quality tissue* (%) per a cada tractament i per a 6 i 8 setmanes.

Contrast	Week	Estimate	SE	t.ratio	p.value
Control - B-TCP-Fn	6 weeks	-19.04	6.74	-2.83	0.024
Control - B-TCP	6 weeks	-20.74	6.74	-3.08	0.014
B-TCP-Fn - B-TCP	6 weeks	-1.70	8.18	-0.21	0.977
Control - B-TCP-Fn	8 weeks	-35.67	7.21	-4.95	<.001
Control - B-TCP	8 weeks	-22.51	6.16	-3.65	<.001
B-TCP-Fn - B-TCP	8 weeks	13.16	8.08	1.63	0.253

**Taula 8:** Resultats de les comparacions de mitjanes entre grups 2 a 2.

De la taula 8 observem que, tant per a la setmana 6 com per a la 8, la mitjana de la variable Quality Tissue va ser significativament menor en grup control que en altres dos grups. Tanmateix, no tenim evidències per concloure aquest mateix resultat entre els grups B-TCP-Fn i B-TCP.

## 5 Discussions

### 5.1 Quantitat de teixit

Pel que fa a la quantitat de teixit format en la cavitat, s'ha trobat que la variable tractament té un efecte significatiu vers la variable *Augmentation Area* (%). D'altra banda, ni la setmana ni la interacció entre setmana i tractament s'han trobat significatives.

Pel que fa als contrastos de mitjanes 2 a 2, s'ha obtingut que la mitjana del grup control va ser significativament menor que la dels grups B-TCP-Fn i B-TCP tant a les 6 setmanes com a les 8 setmanes ( $p < 0,01$  en tot cas). No obstant, no s'han trobat diferències significatives entre les mitjanes dels altres dos tractaments (ni per a les 6 setmanes ni per a les 8).

Així doncs, tenim evidències per dir que els tractaments tenen un efecte significatiu pel que fa a la creació de nou teixit en la cavitat òssia. Tanmateix, tot i que no podem afirmar que un tractament sigui significativament més eficaç que l'altre si s'observa la figura 1, tot sembla indicar que a la setmana 8 el tractament B-TCP va provocar la creació d'una quantitat major de teixit que no pas el tractament B-TCP-Fn.

### 5.2 Qualitat del teixit

#### 5.2.1 Mineralized tissue

D'una banda, pel que fa a la variable *Mineralized tissue* (%), no s'ha trobat que ni el tractament, ni la setmana ni la interacció d'aquests dos termes, tinguin un efecte significatiu vers a la quantitat de teixit mineralitzat format a la cavitat.

Aquest resultat queda corroborat quan es realitzen els contrastos de comparació de mitjanes de grups 2 a 2, ja que en cap cas (per cap dels tractaments entre ells, ni per a la setmana 6 ni per a la 8) s'han obtingut evidències significatives per a rebutjar la igualtat entre mitjanes.

Així doncs, tot sembla indicar que cap dels dos tractaments provoca un increment en la quantitat de teixit mineralitzat a la cavitat. De fet, tenint en compte la figura 2, s'observa que a la setmana 8 el grup control presentava una major quantitat de teixit mineralitzat que no pas els grups de tractament (tot i que aquest increment no es significatiu). A partir d'aquesta figura també destaquem una disminució global (per tots els grups) de la mitjana d'aquesta variable a les 8 setmanes respecte a les 6 (de nou, no significativa).

### 5.2.2. Bone substitute

Tal i com s'ha explicat en la part de resultats, en aquesta secció s'ha exclòs el grup control. No s'han trobat efectes significatius ni del tractament ni de la setmana vers a la variable *bone substitute* (%). En les comparacions de la mitjana d'aquesta variable entre els tractaments B-TCP-Fn i B-TCP per a les 6 setmanes i per a les 8 setmanes, s'ha trobat cap contrast significatiu.

Aquest fet sembla indicar que no hi ha un tractament significativament millor que l'altre. Tanmateix, de nou podem fer observacions mitjançant els gràfics, en aquest cas la figura 3, en la qual s'observa que en la setmana 8 el tractament B-TCP va produir una quantitat de *bone substitute* lleugerament superior que no pas el tractament B-TCP-Fn.

### 5.2.3. Quality tissue

L'objectiu de la creació d'aquesta nova variable no inclosa en l'estudi s'ha assolit amb èxit, ja que mitjançant aquesta la detecció de diferències de qualitat de teixit entre grups han estat detectades.

D'una banda s'ha trobat un efecte significatiu del tractament vers aquesta variable ( $p = 0,004$ ), a diferència de la variable setmana, la qual no s'ha trobat significativa.

Aquest fet queda reflectit en els contrastos 2 a 2 entre grups per a la mitjana d'aquesta variable, mitjançant els quals s'han detectat diferències de mitjanes entre el grup control i ambdós tractaments, tant a la setmana 6 com a la 8.

La situació és similar a la que ens hem trobat en el cas de la variable *Augmentation Area* (%): els tractaments impliquen una millora en la qualitat del teixit creat respecte el grup control però cap dels dos tractaments destaca significativament respecte de l'altre.

**Autorizaciones para el procedimiento de investigación animal (abril, 2012;  
marzo, 2014)**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



CEEAA  
(Comitè Ètic d'Experimentació Animal)

Centres Científics i Tecnològics  
Salé i Sabaris, 1-3  
08028 Barcelona  
Tel. 934037044  
ceea@ccitl.uib.edu

**COMITÈ ÈTIC D'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL (CEEAA)**

**Formulari d'acceptació de procediments**

**DADES PROCEDIMENT**

**Títol:** Estudi de la eficàcia de la regeneració dels defectes ossis alveolars de dimensions crítiques amb fosfat tricàlcic associat o no a una proteïna plasmàtica, en la calvaria de la rata adulta

Investigador Responsable: M<sup>a</sup> Àngels Sanchez Garcés

Un cop examinada la documentació presentada, en compliment del Decret 214/97 de la Generalitat de Catalunya, el CEEAA de la UB ha resolt **ACCEPTAR** el procediment sol·licitat.

Signat pels membres del CEEAA que han pres l'acord

Barcelona, 19 d'abril del 2012

NOTA: El CEEAA delega en el/la responsable en benestar animal de la Unitat d'Experimentació Animal on s'allotjaran els animals, el seguiment de la realització del procediment d'acord amb el que està establert a la memòria aprovada per aquest comitè.

UNIVERSITAT DE BARCELONA	
Comitè Ètic d'Experimentació Animal	
Data:	23 MAIG 2012
Resposta:	
Sol·licitat:	346/12



UNIVERSITAT DE BARCELONA



C.E.E.A.  
(Comitè Ètic d'Experimentació Animal)

Centres Científics i Tecnològics  
8048 i 8049, L-3  
08028 Barcelona  
Tel. 93-4037046  
ceea@ccit.ub.edu

## COMITÈ ÈTIC D'EXPERIMENTACIÓ ANIMAL (CEEA)

### Formulari d'acceptació de procediments

#### DADES PROCEDIMENT

**Títol:** Estudi de l'eficàcia de la regeneració dels defectes ossis alveolars de dimensions crítiques amb fosfat tricàlcic associat o no a una proteïna plasmàtica, en la calvaria de la rata adulta

Investigador Responsable: M<sup>a</sup> Àngels Sanchez Garcés

Un cop examinada la documentació presentada, en compliment del Decret 214/97 de la Generalitat de Catalunya, el CEEA de la UB ha resolt **ACCEPTAR** el procediment sol·licitat.

Signat pels membres del CEEA que han pres l'acord

Barcelona, 4 de març del 2014

NOTA: El CEEA delega en ella responsable en benestar animal de la Unitat d'Experimentació Animal on s'allotjaran els animals, el seguiment de la realització del procediment d'acord amb el que està establert a la memòria aprovada per aquest comitè.

REGISTRE	
C.E.E.A.	
Comitè Ètic d'Experimentació Animal	
Data:	28 MARÇ 2014
Empleat:	





Generalitat de Catalunya  
 Departament d'Agricultura, Ramaderia,  
 Pesca, Alimentació i Medi Natural  
 Serveis Territorials a Barcelona  
 Àrea del Medi Natural

Generalitat de Catalunya  
 Serveis Territorials d'Agricultura,  
 Ramaderia, Pesca, Alimentació i  
 Medi Natural a Barcelona

Número: 0006S/6199/2014  
 Data: 22/05/2014 11:26:08

Registre de sortida

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
**CEEA-UB (Comitè Ètic d'Experimentació Animal)**  
 A/A Álvaro Gimeno Sandig  
 Edifici Florensa, c/ Adolf Florensa nº 8, 1ª planta, despatx F14  
 08028 Barcelona

Assumpte: Procediment d'experimentació núm. **6504**  
 (expedient B-RP-093/14)

Senyor,

Hem rebut la sol·licitud de pròrroga de validesa de procediments que no requereixen autorització expressa del procediment:

**Títol:** " Estudi de l'eficàcia de la regeneració dels defectes ossis alveolars de dimensions crítiques amb fosfat tricàlcic associat o no a una proteïna plasmàtica, en la calvária de la rata adulta "

**Investigador/a responsable:** M<sup>a</sup> Àngels Sanchez Garcés

Aquest procediment té assignat el número d'ordre DAAM: **6504**.

D'acord amb l'article 32 del Decret 214/1997 de 30 de juliol sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques té una validesa fins el **29 de maig de 2016**, sempre i quan no existeixi cap modificació del procediment.

Durant el primer trimestre de cada any, haureu d'afegir el nombre d'animals utilitzats en aquest procediment en les taules estadístiques normalitzades pel Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente que us trametrem.

Atentament,

El cap de l' Àrea del Medi Natural

  
 Luís Vázquez Rivas

Barcelona, 21 de maig de 2014  
 lp

REGISTRE	
C.E.E.A. Comitè Ètic d'Experimentació Animal	
Data:	29 MAIG 2014
Entrada:	133/14
Sortida:	

Bell 228/14

**Artículo publicado en la revista científica *Clinical Oral Implant Research*  
(COIR) por primera vez el 28 de Septiembre de 2018**

