

# ESTUDIO HISTOMORFOLÓGICO DE LA CAPACIDAD DE REGENERACIÓN ÓSEA DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS, MÉDULA ÓSEA Y FOSFATO TRICÁLCICO. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CERDOS "REGENERACIÓN ÓSEA EN CIRUGÍA EXPERIMENTAL EN CERDOS"

## HISTOMORPHOLOGICAL STUDY OF THE BONE REGENERATION CAPACITY OF PLATELET-RICH PLASMA, BONE MARROW AND TRICALCIUM PHOSPHATE. EXPERIMENTAL STUDY ON PIGS "BONE REGENERATION IN EXPERIMENTAL SURGERY ON PIGS"

Castañeda-Vega Paul<sup>1</sup>, López-López José<sup>2</sup>, Chimenos-Küstner Eduardo<sup>2</sup>, Manzanares-Céspedes Cristina<sup>3</sup>, Muñoz-Sánchez Juan<sup>4</sup>, Jané-Salas Enric<sup>5</sup>, Álvarez-López José<sup>6</sup>, Gimeno-Sanding Alvaro.<sup>7</sup>

Castañeda-Vega P. López JM, Chimenos-Küstner E, Manzanares-Céspedes C, Muñoz-Sánchez J, Jané-Salas E, Alvarez-López JM, Gimeno-Sanding A. Estudio histomorfológico de la capacidad de regeneración ósea del plasma rico en plaquetas, médula ósea y fosfato tricálcico. Estudio experimental en cerdos "regeneración ósea en cirugía experimental en cerdos" Revista Kiru. 2010; 7(1): 25-33

### RESUMEN

**Objetivo:** Se valora histomorfológicamente la capacidad de regeneración ósea del plasma rico en plaquetas, a distintas concentraciones, y el extracto de médula ósea rico en plaquetas, en comparación con  $\beta$ -fosfato tricálcico.

**Material y Método:** Se realiza un trabajo experimental en 8 cerdos, a los que se les practican trepanaciones mandibulares para colocar los materiales a estudio. Las muestras obtenidas se observan mediante microscopio electrónico y se realizan fotografías sistemáticas para analizarlas mediante un sistema de histograma de grises.

**Resultados:** Los fenómenos de osificación se aprecian en el 96% de los defectos practicados, con independencia del material empleado para rellenarlo. Se aprecia que el plasma rico en plaquetas (PRP) y la médula ósea (M) muestran un grado de osteogénesis equivalente, 12,3 y 13,4 respectivamente más potencia que el control. El plasma pobre en plaquetas (PPP) presenta una capacidad semejante a los controles (C) con una media de sustracción de 14,03 y 14,12 respectivamente. El fosfato tricálcico (FT) se muestra efectivo como elemento inductor de osificación, 3,03 veces más potente que el control.

**Conclusiones:** La osificación se presenta en la mayor parte de los defectos practicados. El PRP y la M son los elementos con más capacidad osteogénica y el PPP no se muestra más efectivo que el control.

**Palabras clave:** Regeneración ósea, fosfato tricálcico, plasma rico en plaquetas.

### ABSTRACT

**Objective:** On numerous occasions after the oral surgery bone defects occur which may be difficult to repair. *Objective:* We assessed the histomorphologic bone regeneration capacity of platelet-rich plasma at different concentrations, and extract bone marrow platelet-rich, compared with  $\beta$ -tricalcium phosphate.

**Material and Methods:** We performed an experimental study in 8 pigs, who are practicing trepanaciones jaw to move the materials to study. The samples obtained were observed through electronic microscope and systematic photographs were made to analyse them through a system of gray histogram.

**Results:** Ossification Phenomena were seen in 96% of the defaults practiced with independance of the material used to fill them. It is appreciated that the platelet-rich plasma (PRP) and bone marrow (M) show an equivalent degree of osteogenesis, 12.3 and 13.4 respectively, more power than the control. The platelet-poor plasma (PPP) provides a capability similar to controls (C) with an average of 14.03 and 14.12 abduction respectively. Tricalcium phosphate (FT) is effective as an inducer of ossification, 3.03 times more potent than the control.

**Conclusions:** The ossification occurs in most of the charged defects. The PRP and the M are the most osteogenic capacity and the PPP is no more effective than control.

**Key words:** Bone regeneration, tricalcium phosphate, platelet-rich plasma.

<sup>(1)</sup> Odontólogo. Máster en Medicina Bucal. Postgrado en Medicina Bucal. Facultad de Odontología, Universidad de Barcelona.

<sup>(2)</sup> Doctor en Medicina y Cirugía. Médico especialista en Estomatología. Profesor Titular de Medicina Bucal. Facultad de Odontología, Universidad de Barcelona.

<sup>(3)</sup> Doctora en Medicina y Cirugía. Profesora Titular de Anatomía. Facultad de Odontología. Universidad de Barcelona.

<sup>(4)</sup> Doctor en Medicina y Cirugía. Médico especialista en Hematología. Profesor Asociado de Medicina Bucal. Facultad de Odontología, Universidad de Barcelona. Médico Adjunto de Hematología. Ciudad Sanitaria de Bellvitge.

<sup>(5)</sup> Doctor en Medicina y Cirugía. Médico especialista en Estomatología. Profesor Asociado de Medicina Bucal. Facultad de Odontología, Universidad de Barcelona

<sup>(6)</sup> Ingeniero en Imagen y Sonido. Profesor Contratado de Computación. Universidad Autónoma de Barcelona.

<sup>(7)</sup> Veterinario. Responsable del Estabulario del Campus Universitario de Bellvitge. Universidad de Barcelona.

### Correspondencia

Dr. Paul Castañeda Vega  
 Departament d'Odontoestomatologia  
 Pavelló de Govern, 2a planta  
 Av. Feixa Llarga, s/n  
 08907 L'Hospitalet de Llobregat .Barcelona-España  
 correo electrónico: paul\_isac@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

En la práctica odontológica, existen numerosos procedimientos quirúrgicos que tienen como complicación la pérdida de tejido óseo (exodoncia, cirugía protésica, tratamiento de lesiones osteolíticas, tratamiento de tumores, etc.), que provocan lesiones cavitarias óseas extensas<sup>1</sup>. Estas cavidades pueden ocasionar complicaciones, tales como aparición de fracturas patológicas, osteoporosis, reactivaciones de infecciones y dificultad para la restauración protética, entre otros procesos. Para evitar estas complicaciones se recurre a la colocación de injertos óseos<sup>2</sup>. La utilización del autoinjerto puede no ser suficiente para rellenar cavidades extensas. Por otra parte, la utilización del aloinjerto ha sido prácticamente abandonada, debido al alto índice de reacciones de hipersensibilidad que se pueden producir<sup>2</sup>. Estos hechos han favorecido que desde hace años se utilicen técnicas de "regeneración" e inducción ósea, utilizándose materiales inorgánicos similares a la matriz ósea, especialmente hidroxiapatita, y en los últimos años,  $\beta$ -fosfato tricálcico entre otros biomateriales<sup>3-5</sup>. De esta manera se intentan minimizar los problemas del edentulismo, que implican una reducción del soporte, que dificulta o incluso imposibilita la rehabilitación mediante prótesis dentarias removibles. Si elegimos la extracción dentaria como ejemplo, sabemos que se genera una respuesta reparadora, caracterizada por una reabsorción ósea de la superficie alveolar y un depósito de nuevo tejido en el alveolo vacío. La magnitud de la reabsorción ósea progresiva depende de la interacción de múltiples factores: anatómicos, sexuales, biológicos, mecánicos y quirúrgicos entre otros. Existen en la literatura numerosos trabajos que valoran la capacidad de regeneración del propio hueso, de forma fisiológica o en asociación a biomateriales, pero los resultados son contradictorios y difíciles de cuantificar<sup>6-8</sup>, aspecto que justifica la investigación sobre el tema.

Ante estas premisas, nos planteamos el **objetivo**: valorar el grado de regeneración ósea que se obtiene en mandíbulas de cerdo, utilizando plasma rico en plaquetas, a distintas concentraciones, y extracto de médula ósea rico en plaquetas, en comparación con  $\beta$ -fosfato tricálcico y un control "no intervenido".

## MATERIAL Y MÉTODO

### Animales de experimentación

Se realiza el estudio en 10 hemimandíbulas, pertenecientes a ocho cerdos híbridos machos de 3 meses de edad. Su peso es de 22,5 +/- 2,5 kg. Los animales se someten a una cirugía experimental. Después de la cirugía se mantienen en el estabulario del Campus Universitario de Bellvitge durante dos meses,

realizándose los controles y cuidados postoperatorios correspondientes. El mantenimiento y cuidado de los animales de experimentación se lleva a cabo siguiendo los principios generales del Consejo Nacional de Investigación (*National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1995*), citados por Bayne<sup>9</sup> y que en España se recogen en: Boletín Oficial del Estado nº 252 (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, B.O.E. nº 252 de 21 de octubre de 2005). A los dos meses son sacrificados, para obtener las muestras que serán evaluadas. Los aspectos referentes al cuidado y mantenimiento de los animales se especifican en la memoria presentada y aceptada por el CEEA (*Comitè Ètic d'Experimentació Animal*) de la Universitat de Barcelona, aprobada en fecha 16 de junio de 2005.

## PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Las intervenciones quirúrgicas se realizan en tres días de quirófano y las muestras operatorias para estudio son obtenidas tras el sacrificio de los animales (en tres días diferentes) a los dos meses (+/- una semana) de la intervención.

Bajo anestesia general y con una técnica de abordaje externo mandibular<sup>10</sup>, se practican diez fenestraciones de 8mm de profundidad mediante una fresa de 3,8mm de diámetro (fresa SDHQ4® de la marca Biomedica Trinion S.L., *Trinion Titanium GmbH, Karlsrhue, Germany, certificate registration nº 0032.01.01/0*). En seis de los cerdos se elige una hemimandíbula aleatoriamente y en los dos últimos cerdos, se intervienen ambas hemimandíbulas, con el fin de ampliar la muestra. Para la realización de las trepanaciones de forma equiparable, se utiliza una plantilla, a modo de férula quirúrgica, confeccionada con Boswort Trim® (*Temporary Resin Acrylic, Chesapeake Beach, USA*).

Las diferentes trepanaciones realizadas se rellenan con los materiales del estudio, excepto dos, que se dejan sin relleno y que serán considerados las trepanaciones control. El operador conoce el material que se está utilizando en cada defecto óseo, pero no tiene acceso a la documentación en la que se anotan los datos: 1) Control (C), ningún material. 2) Plasma pobre en plaquetas (PPP), con una concentración <500.000 plaquetas/ml. 3) Plasma rico en plaquetas (PRP), con una concentración >500.000 plaquetas/ml. 4) Médula ósea (M), procedente del propio animal. 5)  $\beta$ -Fosfato tricálcico (FT), polvo fino de la marca Cerasorb® (*Curasan AG, Lindigstraße4, 63801 Kleinostheim, Germany*). Todos los defectos (excepto los controles) se rellenan en su totalidad con el material de estudio, pero en el caso del fosfato tricálcico se utilizan 0,3 gramos de material en cada defecto practicado.

En todos los cerdos se ha seguido el mismo protocolo y en los operados de las dos hemimandíbulas, primero se ha operado la derecha y seguidamente la izquierda. Se

ha aplicado un sistema de marcaje para poder localizar mejor la zona intervenida (Chinchetas de titanio de 3mm, marca IMTEC®EC-9503, *TiTac system, 3M Company, Las Alamos, New Mexico*). Una vez realizada la cirugía se cierra por planos y se procede a inyectar (de forma profiláctica) por vía intramuscular Terramicina® 100, laboratorios Pfizer (25mg/Kg). La analgesia postquirúrgica se llevó a cabo mediante la administración de Meloxicam (Metamecam® solución inyectable 5mg/ml), 5mg/20Kg/24h.

#### **Obtención del PPP, PRP y M**

Para la obtención de plasma pobre y plasma rico se adoptan los criterios establecidos inicialmente por Marx y col (10). Se realiza una extracción de sangre (utilizando una vía previamente colocada). Se obtiene sangre venosa (vena cubital) en tubos citrados de 5 ml, 4 tubos por animal de experimentación. La muestra obtenida se somete a una centrifugación, para obtener tanto el PRP rico como el pobre en plaquetas. Se centrifuga a 500 g (Selecta®) durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante, fundamentalmente la zona de *buffy-coat* (interfase leucocitos – plasma). El producto obtenido es el plasma pobre en plaquetas, con una concentración plaquetar media de  $200 \times 10^9/l$ . Este plasma recogido se vuelve a centrifugar a 500 g durante 10 minutos, se desprecia el sobrenadante y el resto del producto corresponde al plasma rico en plaquetas, con una concentración plaquetar media de  $>500 \times 10^9/l$ . El plasma pobre en plaquetas y el plasma rico en plaquetas se activan, antes de colocarlo en la zona de trabajo, con cloruro cálcico al 10%, en una proporción de 1/50. Para obtener la médula ósea (M), se realiza la punción mediante un troquer de biopsia ósea a nivel de la cresta iliaca, previa anestesia local, aspiración de la médula ósea en el mismo acto operatorio. Una vez obtenida se realiza una centrifugación a 100 g, para separar hemáties y obtener una concentración elevada de leucocitos. Se obtienen entre 3-5 ml de médula ósea en 1 sola punción. La médula se recoge en tubos citrados de 5ml; una vez separado el sobrenadante del centrifugado, se activa su coagulación mediante cloruro cálcico al 10%, en una proporción de 1/50.

#### **Estudio histológico**

Las muestras obtenidas son conservadas en formol al 10% y posteriormente son procesadas siguiendo las indicaciones de la Unidad de Anatomía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Barcelona y en base a los criterios establecidos por Donath en 1985<sup>11</sup>. No son sometidas a un proceso de decalcificación previo, se realiza un proceso de fijación, seguido de la deshidratación y preinclusión en polímeros de metilmetacrilato (Technovit®, *Esact-Kultzer, Warhrheim, Alemania*). Posteriormente se incluyen en un producto fotopolimerizable que permite obtener un bloque rígido (aparato de fotopolimerización: *Kultzer-Exakt-*

*light-polymerisation*®, *Exakt, Nordenstedt, Alemania*). Este bloque es montado y seccionado con una sierra de banda de filo diamantado (*Exakt micro-parallel-grinding System*®; *Exakt, Nordenstedt, Alemania*) y finalmente son erosionadas y pulidas (papel de lija de grano 1200 y 4000) para permitir su estudio mediante Microscopio Electrónico.

Las muestras son analizadas mediante Microscopía electrónica de barrido con electrones secundarios (MEB) o Retrodispersados (backscattered) (MEB-ES): LEO200®, Cambridge, Gran Bretaña, (*Serveis Científico-Tècnics, Universitat de Barcelona*).

Todas las muestras obtenidas son observadas a diferentes aumentos para valorar la calidad de la reparación ósea en base a la presencia de los diferentes tejidos óseos.

#### **Análisis cuantitativo**

Una vez observadas las muestras, se toman fotografías, con el fin de realizar un estudio cuantitativo mediante técnicas clásicas de tratamiento de imagen digital, utilizando el lenguaje de Matlab<sup>12</sup>. Las imágenes se obtienen mediante el software del MEB que proporciona imágenes de 1.024x1.024 píxeles con una zona central útil de 1004x753 píxeles. Cada píxel se codifica en una escala de 256 niveles en el rango [0,1]. Las imágenes obtenidas a 20 aumentos son las que utilizamos para el análisis. Estas imágenes se obtienen con una resolución de 152 píxeles por mm en horizontal y 114 píxeles por mm en vertical. Esta diferencia se debe a la relación de aspecto 4x3 de la imagen. En cada imagen se analizan tres porciones. Por un lado dos círculos concéntricos de 4mm y 1mm coincidentes con el centro geométrico subjetivo del defecto practicado en la hemimandíbula (los círculos se transforman en elipses en la imagen por la diferencia de resoluciones en horizontal y vertical). La tercera porción corresponde al resto de la imagen, es decir, a la periferia de la trepanación (Figura 1). También se analizan 10 fotografías correspondientes a una hemimandíbula no intervenida con el fin de obtener un patrón medio.

#### **Análisis estadístico**

Las medias entre las diferencias se han comparado mediante ANOVA entre los distintos grupos estudiados. Se ha procedido a las comparaciones post hoc utilizando el test de Sheffe. El nivel de significación se ha establecido en  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

De los ocho cerdos utilizados en el estudio, uno de ellos muere por complicaciones postoperatorias (el animal número cinco). En ninguno de los cerdos se aprecian queloides o cicatrices hipertróficas en la zona operatoria. Sólo la hemimandíbula intervenida del cerdo número cuatro presenta un engrosamiento observable macroscópicamente con respecto a la

hemimandíbula control.

Dado que un cerdo muere, se obtienen un total de 9 hemimandíbulas para el estudio (cinco proceden de las hemimandíbulas de los cinco animales del primer grupo y las cuatro restantes de las dos hemimandíbulas de los dos del segundo grupo). Se recogen además cinco muestras correspondientes a las hemimandíbulas no operadas de los cinco primeros cerdos.

Se realizan un total de 100 trepanaciones (10 trepanaciones en cada hemimandíbula). Como el animal nº 5 muere, no se incluye en el estudio y quedan 90 fenestraciones para estudiar (18 para cada material de relleno) (Figura 2). Una vez procesadas para su estudio las hemimandíbulas obtenidas, no se localizan para los estudios de microscopía 15 de las fenestraciones realizadas: nueve del cerdo 1 (se pierden todas menos una que corresponde a FT), una del cerdo 2 (corresponde a M), tres del cerdo tres (corresponden a FT, C y PPP); y dos del cerdo número seis (corresponden a PRP y PPP). De esta manera, se dispone de 75 defectos practicados para estudio mediante microscopía electrónica. Las 75 trepanaciones restantes se distribuyen en: 15 C, 16 FT, 14 PPP, 15 PRP y 15 M (Tabla 1).

Un 96% de las trepanaciones estudiadas (N=75) muestran un proceso de neoformación ósea mediante osificación membranosa. En los defectos practicados se observa la presencia de cantidades variables de tejido condroide, que es sustituido por hueso fibrorreticular y después a su vez lo es por hueso laminar. Las numerosas líneas cementantes visibles muestran la abundante actividad osteoclástica y el recambio en el sistema de fuerzas (*cutting cones*) (Figura 3). Los tres defectos en los que no se evidencia actividad de formación ósea corresponden a dos fenestraciones control y una fenestración tratada con plasma pobre en plaquetas; este aspecto se evidencia por la ausencia de tejidos de reparación y por el mantenimiento de diámetros

semejantes a los originales de las lesiones.

De las 18 trepanaciones en las que se coloca  $\beta$ -fosfato tricálcico, dos no se pueden localizar y de las 16 restantes se aprecian restos del material empleado en 3 de ellas (18,75%).

Tal y como se describe en la metodología, la Figura 1 muestra cómo se obtienen los datos para cada una de las fotografías (realizadas a 20 aumentos) de los defectos practicados. Se obtiene un histograma para cada una de las porciones analizadas y luego se comparan entre sí. Si analizamos las medias de las diferencias entre histogramas H1-H2 (región periférica menos región central de 4mm), para cada uno de materiales de relleno, podemos apreciar: 14,1, para los C, 4,64 para FT, 14,03 para PPP, 1,105 para M y 1,14 para PRP. Si agrupamos los datos en relación a la comparación en la imagen y el histograma teórico obtenido con diez fotografías de una mandíbula no intervenida (HM), podemos apreciar que hay una concordancia de datos entre H1-H2, H1-H3 y H2-H3 para cada uno de los materiales utilizados. Esta concordancia no se mantiene al comparar con el patrón estándar (H1-HM, H2-HM, H3-HM). (Tabla 2).

Como resultado del análisis estadístico podemos determinar que para H1-H2, las medias son distintas a las de los controles en todos los grupos menos en plasma pobre. Para H1-H3, las medias son distintas en todos los grupos respecto a los controles. Para H2-H3, las medias son distintas a las de los controles en todos los grupos menos en plasma pobre. Para H1-HM, las medias de los controles solo son distintas respecto al grupo fosfato tricálcico. Para H2-HM, las medias son distintas a las de los controles en todos los grupos menos en plasma pobre y para H3-HM, las medias son distintas a las de los controles en todos los grupos menos en plasma pobre.

**Tabla 1**  
Se muestra los datos de las 100 trepanaciones practicadas.

	1A	2A	3A	4A	5A	1B	2B	3B	4B	5B
<b>Cerdo 1</b>	C	M	PRP	FT	M	C	PPP	PRP	FT	PPP
<b>Cerdo 2</b>	M	PRP	C	M	FT	PPP	C	FT	PRP	PPP
<b>Cerdo 3</b>	FT	PRP	PRP	M	FT	PPP	M	C	C	PPP
<b>Cerdo 4</b>	C	FT	PRP	PPP	M	FT	C	PRP	PPP	M
<b>Cerdo 5 (RIP)</b>	M	FT	FT	C	C	PPP	PPP	M	PRP	PRP
<b>Cerdo 6</b>	PPP	PRP	C	FT	M	PPP	PRP	C	FT	M
<b>Cerdo 7 (derecha)</b>	C	PRP	PPP	M	FT	C	PRP	FT	PPP	C
<b>Cerdo 7 (izquierda)</b>	PPP	FT	M	PPP	PRP	M	C	PRP	C	FT
<b>Cerdo 8 (derecha)</b>	FT	M	C	PRP	PRP	FT	M	PPP	PPP	C
<b>Cerdo 8 (izquierda)</b>	C	PPP	PRP	FT	M	M	PPP	PRP	FT	C

Las 10 del cerdo número 5 (animal fallecido) no se consideran; de las 90 restantes resultan efectivas para el estudio 75 (83,3%). Se distribuyen en: 15 controles, 16  $\beta$ -Fosfato tricálcico, 14 plasma pobre, 15 plasma rico y 15 médula ósea.

(Se han sombreado las fenestraciones que no hemos podido localizar después del procesado, bien por

fallecimiento del animal o por problemas en el procesado)

-C: Control, ningún material; -PPP: Plasma pobre en plaquetas, con una concentración <500.000 plaquetas/ml; -PRP: Plasma rico en plaquetas, con una concentración >500.000 plaquetas/ml; -M: Médula ósea procedente del propio animal; -FT:  $\beta$ -Fosfato tricálcico.

**Tabla2.**  
Descripción entre las tablas y grupos de las diferencias

GRUPO		H1-H2	H1-H3	H2-H3	H1-HM	H2-HM	H3-HM
C	Media	14,1280	22,7713	7,5800	41,6393	44,1540	44,0893
	N	15	15	15	15	15	15
	SD	0,80786	3,53930	,65406	2,08239	1,90501	2,23374
FT	Media	4,6444	11,2713	3,5075	19127,4850	29,0406	33,8969
	N	16	16	16	16	16	16
	SD	0,36809	1,83495	,53503	4306,67246	4,99153	2,87947
PPP	Media	14,0350	27,0636	8,0714	34,8843	37,8771	42,8764
	N	14	14	14	14	14	14
	SD	1,34210	3,22313	1,24103	4,42012	11,12248	10,65474
M	Media	1,1033	1,8527	1,3347	30,7313	30,5107	31,7327
	N	15	15	15	15	15	15
	SD	0,47036	,73499	,05436	1,73479	1,06888	1,27737

Estudio histomorfológico de la capacidad de regeneración ósea del plasma rico en plaquetas, médula ósea y fosfato tricálcico. Estudio experimental en cerdos "Regeneración ósea en cirugía experimental en cerdos"

PRP	Media	1,1460	1,6860	1,7133	27,8400	29,6720	33,5100
	N	15	15	15	15	15	15
	SD	0,07327	,64409	,16487	2,48115	2,08232	,84636
Total	Media	6,8861	12,7184	4,3805	4107,0840	34,1331	37,1013
	N	75	75	75	75	75	75
	SD	5,94590	10,65515	2,92486	8109,83819	7,98840	7,06381

-SD: Desviación estándar; -C: Control, ningún material; -PPP: Plasma pobre en plaquetas, con una concentración <500.000 plaquetas/ml; -PRP: Plasma rico en plaquetas, con una concentración >500.000 plaquetas/ml; -M: Médula ósea procedente del propio animal.

-FT:  $\beta$ -Fosfato tricálcico.

-H1-H2: Diagrama de grises de la región externa restando el centro de 4 mm.

-H1-H3: Diagrama de grises de la región externa restando el centro de 1 mm.

-H2-H3: Diagrama de grises de las dos regiones centrales (4 y 1 mm).

-H1-HM: Diagrama de grises de la región externa restando un valor medio elaborado previamente.

-H2-HM: Diagrama de grises de la región central de 4 mm restando un valor medio elaborado previamente.

-H3-HM: Diagrama de grises de la región central de 1 mm restando un valor medio elaborado previamente.

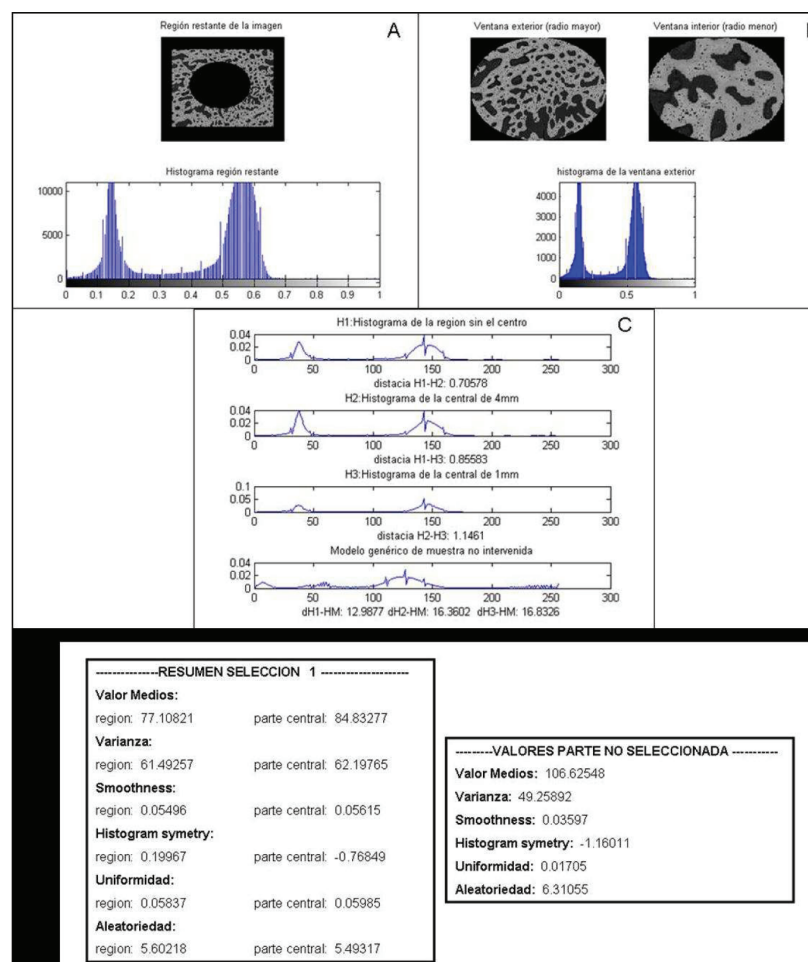


Fig. 1. Datos que se obtienen en cada fotografía de 20x, la fotografía corresponde a una trepanación rellena con médula ósea.

En A) se presenta el histograma para la región restante tras extraer el círculo (ovalo) de 4mm (H1). En B) se presenta el histograma correspondiente al círculo de 4mm (H2), ventana exterior y de 1mm (H3), ventana interior. En C) la comparación entre histogramas; diferencia entre H1-H2 (región externa y centro de 4mm); diferencia entre H1-H3 (región externa y el centro de

1mm); H2-H3 (región de 4mm y región de 1mm) y H1-HM, H2-HM, H3-HM (diferencias entre las diferentes regiones y un histograma estándar elaborado con 10 fotografías de la hemimandíbula no operada). En los cuadros se presentan los valores matemáticos que obtiene el programa para cada región.

Cada una de ellas se rellena por un material (excepto

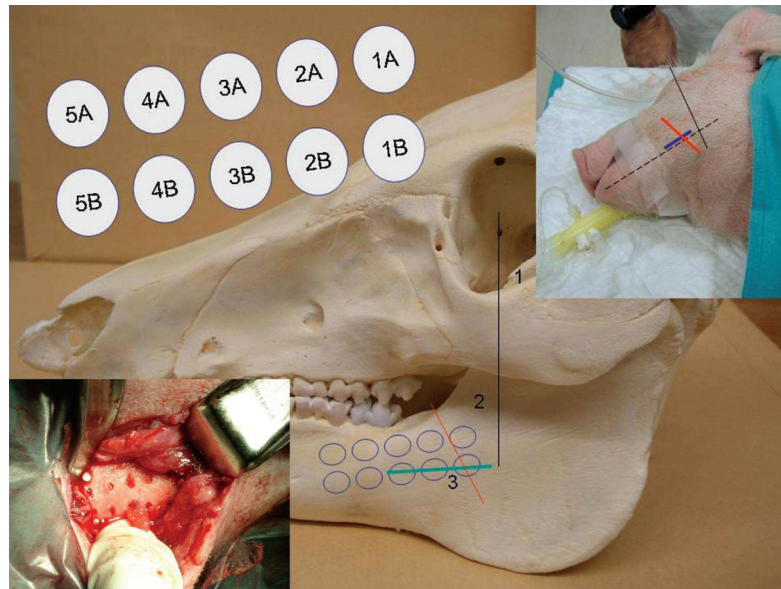


Fig. 2. Dibujo mostrando la distribución de las trepanaciones realizadas en las hemimandíbulas.

dos que se consideran control). 1) Línea media pupilar; 2) Inserción anterior del masetero; 3) Vía de abordaje. En la imagen superior derecha e inferior izquierda se presenta la simulación y la cirugía correspondiente al

animal número 4. Los diagramas 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A y 5B corresponden a los cinco materiales empleados en el estudio (C, PPP, PRP, M y FT). También se ven las lagunas del *Woven Bone* (WB) de

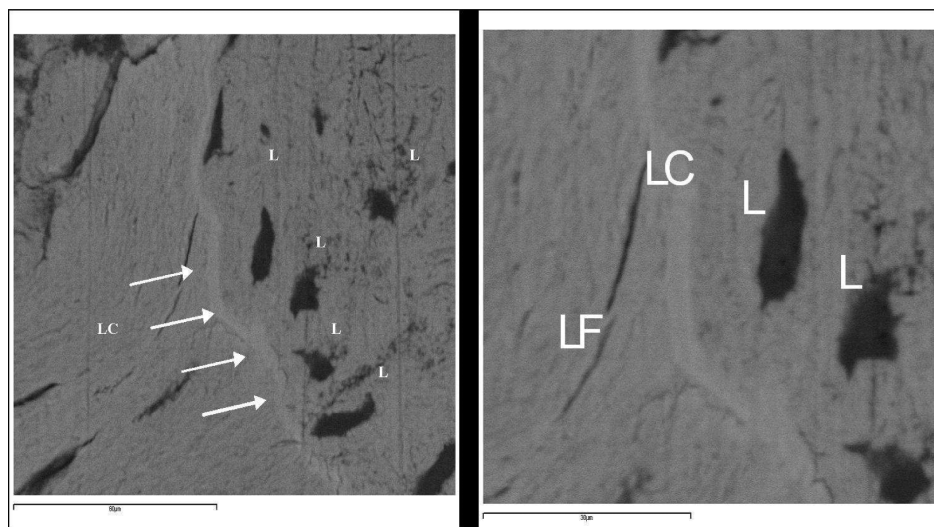


Fig. 3. En imagen de la izquierda (1000x) se ve el aspecto morfológico de la línea cementante (flechas).

forma poligonal, grandes y desordenadas, típicas del hueso fibrorreticular (L). En la imagen de la derecha misma zona a 2000x, se aprecia la línea cementante (LC), también se puede valorar la diferencia morfológica entre una línea de fractura producida en el manejo de la muestra (LF) y la línea ce.

## DISCUSIÓN

Para el abordaje quirúrgico se emplea una técnica propia, que limita los efectos postoperatorios y permite sistematizar el estudio (Figura 2). El estudio macroscópico de las muestras operatorias aporta pocos datos, tan sólo en el animal número cuatro se pudo observar un engrosamiento de la mandíbula intervenida con respecto a la mandíbula control, creemos que la intervención ocasiona poca distorsión en los animales por ser animales muy jóvenes. La pérdida de 15 trepanaciones para el posterior estudio histológico se atribuye a la complejidad de la técnica empleada para la preparación de las muestras<sup>11</sup>. Estamos incluyendo, cortando y puliendo un bloque en el que esta incluida la muestra intervenida, pero se van perdiendo las referencias externas a medida que se va realizando el proceso, de ahí que en la manipulación de las primeras se produzcan más errores.

La observación microscópica de las diferentes muestras permite valorar diferentes grados de osificación, aspecto en el que no se aprecian diferencias aparentes en los diferentes defectos practicados. En tres de las 75 trepanaciones (4%) se produce el efecto vacío y el organismo reacciona de forma negativa. Hemos de tener presente que el proceso de osificación es semejante, con independencia del trauma ocasionado. Inicialmente hay una reacción humoral en la que juegan un papel esencial diversos factores de crecimiento<sup>13</sup>, con una importante actividad osteoclástica que queda reflejada en la presencia de la línea cementante, que luego es seguida por la formación de la nueva lamela ósea por las *lining cells* (Figura 3). Estas células alineadas no siempre forman hueso laminar sino que pueden formar tejido condroide en forma de finas trabéculas. Es un tejido con formaciones trabeculares delgadas que presenta un aspecto fuertemente calcificado, con matriz escasa, irregular y en ocasiones surcado de estrías que corresponden a la inserción de las fibras de colágeno. Las lagunas celulares son grandes irregulares y característicamente confluentes. La siguiente fase en la reparación del defecto o fractura es la aposición de hueso fibrorreticular (*woven bone*), sobre las trabéculas del tejido condroide. Es un tejido óseo más regular, con una matriz extracelular menos calcificada y con lagunas celulares no excesivamente grandes, poligonales y aisladas, están situadas sobre las trabéculas de tejido condroide previo. Posteriormente se produce una intensa remodelación basada en la marcada presencia

vascular, apreciándose numerosos elementos vasculares, unos procedentes de la cortical preexistente y otros del callo perióstico al que da lugar la reacción subperióstica y que fueron descritos inicialmente como *cutting-filling-cones* por Roberts en 1992<sup>14</sup>. Estos conos suelen tener en su extremo un grupo de osteoclastos, seguidos de una hilera de células osteoformadoras (*lining-cels*). Estas estructuras son las responsables de que el callo de fractura se remodele con la formación de hueso laminar.

El  $\beta$ -fosfato tricálcico es ampliamente recomendado como uno de los materiales ideales para el relleno de defectos óseos, tanto por su biocompatibilidad, como por su capacidad de osteoinducción y de degradación y sustitución por tejido óseo neoformado en pocos meses<sup>15,16</sup>. En nuestro estudio tan sólo en tres de las 18 trepanaciones en la que lo hemos empleado (16 efectivas, dado que dos no las hemos podido localizar) se evidencian restos del mismo a los dos meses, indicando la reabsorción completa del material en el resto de las muestras.

Al analizar las muestras con 20x, obtenemos una ventana de trabajo de 7.5x6mm. Éste es el aumento con el que obtenemos fotografías de cada uno de los defectos para su posterior análisis. El análisis, se basa en el estudio de la gama de grises y se utiliza, como hemos descrito en la metodología el sistema de programación Matlab<sup>12</sup>. Diferentes autores han aplicado técnicas basadas en este sistema de programación en biomedicina<sup>17,18</sup>. Al analizar las muestras, la comparación entre las regiones se realiza utilizando el histograma de las porciones. Se utiliza como medida de semejanza entre histogramas el error cuadrático medio de los histogramas previamente suavizados con un filtro paso bajo. El rango del error se establece entre 1 y 100, por tanto a menor error, mayor similitud entre muestras, o lo que es lo mismo mayor similitud entre las zonas con material de relleno y su entorno. Mediante el estudio de las porciones analizadas se establecen comparaciones entre diferentes zonas de una misma fotografía, con el fin de determinar cuánto se asemeja la zona en la que se ha colocado el material de relleno con su entorno. Cabría esperar mayor similitud del entorno con el círculo de 4mm que con el de 1mm, aspecto que se constata en los datos obtenidos. Al comparar el resultado con un posible modelo estándar elaborado con 10 fotografías obtenidas en una hemimandíbula no operada, los resultados son dispares. El análisis de estos resultados induce a pensar que el sistema empleado es útil para comparar sectores dentro de una misma fotografía, pero sugieren que la generalización realizada a partir de otras fotografías (muestras diferentes en definitiva), puede no ser correcta.



**Como conclusiones se establece que:**

-La osificación se produce en el 96% de los defectos practicados, sea cual sea el material empleado para rellenarlo, incluidos los controles (C).

-Se aprecia doce veces más neoformación en base al estudio de los histogramas de grises (H1-H2) en los defectos rellenados con PRP y M frente a los controles.

-El Fosfato Tricálcico se muestra efectivo como elemento de osificación en nuestro estudio, tres veces más que los controles en base a los histogramas de grises (H1-H2).

-El PPP no se muestra efectivo en nuestro estudio como método de regeneración ósea frente a los controles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:E47-51
2. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng*. 2004; 10:955-64
3. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19:59-65.
4. Aybar B, Bilir A, Akcakaya H, Ceyhan T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15:119-25.
5. Craig RG, Kamer AR, Kallur SP, Inoue M, Tarnow DP. Effects of periodontal cell grafts and enamel matrix proteins on the implant-connective tissue interface: a pilot study in the minipig. *J Oral Implantol*. 2006; 32:228-36.
6. Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials*. 2008; 29:3983-92.
7. Verdonck HW, Meijer GJ, Laurin T, Nieman FH, Stoll C, Riediger D, et al. Implant stability during osseointegration in irradiated and non-irradiated minipig alveolar bone: an experimental study. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19:201-6
8. Oltramari PV, Navarro Rde L, Henriques JF, Taga R, Cestari TM, Janson G, et al. Evaluation of bone height and bone density after tooth extraction: an experimental study in minipigs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 104:e9-16
9. Bayne K. Developing guidelines on the care and use of animals. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 862:105-10
10. Marx RE Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62:489-96.
11. Donath K. The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (Säge-Schliff (sawing and grinding) technique). *Pat Res Pract*. 1985; 179: 631-3
12. Karpievitch YV, Almeida JS. mGrid: a load-balanced distributed computing environment for the remote execution of the user-defined Matlab code. *BMC Bioinformatics*. 2006; 7:139.
13. Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Min Res*. 2002; 17: 1859-71.
14. Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP, DeCastro RA. Bone physiology and metabolism in dental implantology: risk factors for osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Implant Dent*. 1992; 1:11-21.
15. Antoun H, Bouk H, Ameer G. Bilateral sinus graft with either bovine hydroxyapatite or beta tricalcium phosphate, in combination with platelet-rich plasma: a case report. *Implant Dent*. 2008; 17:350-9.
16. Ridgway HK, Mellonig JT, Cochran DL. Human histologic and clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor and beta-tricalcium phosphate for the treatment of periodontal intraosseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008; 28:171-9.
17. Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*. 2002; 23:4095-103.
18. Nieto L, Moratal D, Martí-Bonmatí L, Alberich A, Galant J. Morphological characterization of trabecular bone structure using high resolution magnetic resonance imaging. *Radiologia*. 2008; 50:401-8.

Recibido: 22/7/2010.

Aceptado para su publicación: 28/8/2010.