



**UNC**

Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL EFECTO DEL  
ALENDRONATO y del HIDRÓXIDO DE CALCIO SOBRE EL  
TEJIDO OSEO”**

TESISTA:

**OD. MARÍA TERESA DE LAS M. GAIT**

DIRECTOR:

**PROF. DRA. MARTA GONZÁLEZ DE CROSA**

**CÓRDOBA, 2009**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO  
DE DOCTOR EN ODONTOLOGIA**

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL  
EFECTO DEL ALENDRONATO y del  
HIDRÓXIDO DE CALCIO SOBRE EL  
TEJIDO OSEO**

Doctorando  
*Od. María Teresa de las M. Gait*

**Año 2009**

## **Director**

**Prof. Dra. Marta González de Crosa**

## **Tribunal de Tesis**

**Prof. Dra. María Elsa Gómez de Ferraris**

**Prof. Dr. Jorge Marcelo Guilligan**

**Prof. Dra. Aida Segura**



*“Cuando no puedas trotar, camina.*

*Cuando no puedas caminar, usa el bastón.*

*Pero nunca te detengas !!!”*

***Madre Teresa de Calcuta***

***Dedicado a:  
mis hijos María Romina y Pablo Nicolás  
a mi marido Alejandro  
y a mis padres***

# INDICE

Certificados.....	5
Agradecimientos.....	9
Resumen.....	11
Abstract.....	14
Introducción.....	16
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	26
Materiales y Métodos.....	28
Resultados.....	39
Análisis Higroscópico.....	40
Análisis Morfológico.....	42
Análisis Morfométrico y Estadísticos.....	64
Análisis Radiográfico.....	91
Discusión.....	96
Conclusión.....	102
Bibliografía.....	105

# **CERTIFICADOS**







# AGRADECIMIENTOS

Desde que inicie mi trabajo de doctorado, se me presentaron problemas físicos y familiares muy delicados que con la ayuda de Dios y de todas estas personas, pude ir solucionando.

En primer lugar quiero nombrar, a la Prof. Dra. Marta Gonzalez de Crosa, que fue mi directora en este trabajo, pilar y sostén en la investigación, a quien en este momento quiero brindarle, no sólo mi agradecimiento, sino también un humilde pero sentido homenaje, a una persona extremadamente capaz, que brindó su enorme capital de conocimientos, a todos aquellos que se le acercaron. Porque si en algo se caracterizó, fue por su gran tenacidad, fortaleza, amor a la vida, inteligencia, capacidad y su enorme generosidad.

Agradezco al Profesor Dr. Alfredo Bass por representar en este momento a mi directora de Tesis.

A los miembros tribunal de Tesis: Prof. Dra. María Elsa Gómez de Ferraris, Prof. Dr. Marcelo Guilligan, y Prof. Dra. Aída Segura, que pusieron todo su empeño para orientarme y ayudarme en este trabajo. A los directivos de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología, de la anterior y de la actual gestión, al personal administrativo de la misma. A la Sra. Decana de la Facultad de Odontología, Dra. Carmen Visvisian.

Al Dr. Luis M. Plavnik, una persona muy especial para mi, no lo siento sólo como un amigo sino como mi hermano del alma, y que fue el gran colaborador de éste trabajo.

Al Prof. Dr. Sambuelli, Decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Católica de Córdoba, a la Sra. Pura, técnica de laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Católica de Córdoba. Al Sr. Ricardo Mattos del Bioterio del Instituto de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Médicas. Al Ingeniero Luis Marcelo Croare, técnico del ABO, y al Prof. Dr. Nazario Kuyumlliam al Dr. Sebastián Fontana, a la Dra. Mabel Brunotto, a la Srta. María Romina Díaz, a la Dra. Alicia Malberti, a todos ellos por ser estrechos colaboradores científicos y técnicos de mi trabajo.

A la Dra. Elda Cabanillas de Paolucci, al Dr. Alfredo Bass y a la Dra. María Laura Irazuzta que permiten mi crecimiento profesional.

A mis Amigos de siempre, Dra. Betina Tolcachir y al Dr. Daniel Wexler que estuvieron presentes siempre en los buenos y malos momentos de mi vida. A Karina y Virginia por su apoyo constante. A mis compañeros de la Cátedra de Ortodoncia “B”,

A una amiga muy especial, la Dra. María Eugenia Battisti.

A Marcelo Cuenca, un amigo muy especial, que me brinda su apoyo espiritual incondicional.

A mis padres, Ernesto y Teresa, que me enseñaron el valor de la vida y me dieron un constante ejemplo de educación y decencia. A mis hermanos Tito, Dany, Raúl y Ana; a mis cuñadas, cuñados y sobrinos. A la familia Díaz

A dos personas muy especiales para mí con las que no puedo compartir este momento, y sé que ellos desde algún lugar me están dando fuerzas y están felices por este logro, son mi tía y segunda madre, tía Zaida, y mi suegro Sindo.

A todos los que de una u otra manera hicieron posible que logre realizar este trabajo

**Y especialmente al pilar, eje y primer motivo de mi vida...  
mi familia, mis hijos Romina y Pablo, y mi marido, Alejandro.**

**!!!GRACIAS!!!**



# **RESUMEN**

Actualmente en Odontología se está brindando gran importancia a las investigaciones de todo tipo de biomateriales y fármacos que puedan mejorar y acelerar la reparación ósea en distintas situaciones clínicas (implantológicas, quirúrgicas, periodontales, etc.), donde existían lesiones del tejido óseo ya sea por razones patológicas, accidentes o traumas.

En tal sentido, tanto el Alendronato (ALN) promotor de la mineralización y potente inhibidor de la resorción ósea, como el Hidróxido de Calcio  $[Ca(OH)_2]$ , utilizado en diferentes situaciones de reparación pulpar, ambos materiales podrían ser capaces de lograr una aceleración o mejorar la reparación ósea.

Por ello, el Objetivo de este estudio fue estudiar el efecto del Alendronato y del Hidróxido de Calcio en la regeneración tisular de cavidades óseas experimentales.

Se utilizaron ratas Wistar machos jóvenes de 200grs de peso corporal promedio (n=68), que fueron anestesiados con una solución de ketamina/xilacina (8mg. y 1,28mg. respectivamente por 100 g. de peso corporal) y en sus patas traseras se le realizó una cavidad de 1,5 mm de diámetro en la zona diafisiaria de ambas tibias. Los animales fueron divididos en dos grupos **Grupo 1:** cavidades rellenas con Alendronato (ALN)(n=32), **Grupo 2:** cavidades rellenas con Hidróxido de Calcio  $[Ca(OH)_2]$ , purissimum (n=32). Ambos grupos tienen sus respectivos controles de n= 32 cada uno. Los animales fueron sacrificados en los siguientes tiempos experimentales 7- 15 y 30 días.

Se realizaron estudios *histológicos* para los cuales las tibias resecadas se fijaron en formaol tamponado, posteriormente desmineralizadas con solución de Acido Nítrico al 7% y procesadas para su posterior inclusión en parafina. Se realizaron cortes y los mismos fueron coloreados con Hematoxilina Eosina y el método tricrómico de Masson.

La *histomorfometría* se realizó mediante un analizador de imagen (programa : “Image Pro Plus”) donde se midió el ancho de las trabéculas óseas neoformadas y se cuantificaron los elementos celulares del tejido óseo neoformado.

El análisis *radiológico* comparando la radiopacidad de las zonas tratadas. Además se utilizó una técnica de procesamiento de imágenes que genera un pseudocolor en donde la densidad óptica se corresponde con diferentes colores, y se genera un volumen virtual con relación a ella. Este método se utiliza para visualizar la diferencia de densidad óptica entre distintas zonas, que se correlaciona con la densidad mineral.

Los datos obtenidos fueron analizados *estadísticamente* según T Student y Mann-Whitney.

**RESULTADOS:** el ALN y el  $\text{Ca}(\text{HO})_2$  en todos los tiempos experimentales no interfieren en la regeneración ósea, comportándose ambos como materiales osteoinductivos y osteoconductivos en el sitio de la cavidad “ad- doc”. Mejorando la calidad del tejido óseo neoformado con un aumento del ancho trabecular y la densidad celular por  $\text{mm}^2$  en el nuevo tejido óseo.

Los resultados mostraron que, con ALN, no existen diferencias estadísticamente significativas en los tres tiempos experimentales, respecto a los anchos trabeculares, en relación a sus respectivos controles. Con respecto al número de células por  $\text{mm}^2$  de superficie ósea neoformada, a los 30 días se encontraron diferencias significativas ( $p=0,0008$ ).

En el grupo tratado con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , se encontró que en todos los tiempos experimentales, los anchos de las trabéculas neoformadas son mayores en los casos problemas que en los controles, presentando diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0000$  a los 7 días,  $p=0,0014$  a los 15 días y  $p=0,003$  a los 30 días). El número de células óseas, por el contrario, fue mayor en los casos controles, pero sin diferencias significativas.

El tejido óseo neoformado en la zona reparada tuvo una radiopacidad similar al hueso normal, lo cual se corroboró radiográficamente, y con el programa “Image Pro Plus 4.1-Surface Plot”

Comparando ambos materiales entre sí, se encontró que con el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , las trabéculas son mayores en los tres tiempos experimentales respecto al ALN, con diferencias estadísticamente significativas, no así en cuanto al número de células por  $\text{mm}^2$  de superficie ósea neoformada.

**CONCLUSIÓN:** El ALN y el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se comportan como materiales osteoinductivos y osteoconductivos que mejoran la calidad del tejido óseo neoformado, favoreciendo así la reparación del tejido óseo

## **ABSTRACT**

Nowadays, in Dentistry, great importance is placed on the research of any kind of biomaterials and drugs that could improve and accelerate the bone repair in different clinical situations (implantological, surgical, periodontal etc.), in which there was bone tissue damage because of pathological reasons, accidents or traumas.

In this sense, the alendronate (ALN), as a promoter of mineralisation and a potent inhibitor of bone resorption, and the Calcium Hydroxide [Ca(OH)<sub>2</sub>], used in different situations of pulp repair, could be able to produce an acceleration or improvement in the bone repair.

For this reason, the aim of this work was to study the effect of Alendronate and Calcium Hydroxide on the tissue regeneration of the experimental bone cavities.

This work has been done with young male Wistar rats weighing 200 g in average (n=68), which were anesthetized with a solution of ketamine/xilazine (8 mg and 1.28 mg respectively/100 g body weight) and a cavity of 1.5 mm diameter was made in their hind legs in the diaphyseal zone of both tibiae. The animals were divided into two groups. **Group 1:** cavities filled with Alendronate (ALN) (n=32). **Group 2:** cavities filled with Calcium Hydroxide [Ca(OH)<sub>2</sub>], purisimum (n=32). Both groups have their respective controls of n=32 each one. The animals were sacrificed in the following experimental times: 7- 15 and 30 days.

*Histological* studies were carried out for which the dried tibiae were fixed and then demineralised with a solution of nitric acid (7%) and processed for then being included in paraffin. Cuts have been made and then coloured using Hematoxiline Eosina and the Masson's trichrome method.

The *morphometric* analyses were done using an image analyser (programme: "Image Pro Plus"), in which the width of the newly-formed osseous trabeculae were measured and the newly-formed cellular elements were quantified.

The *radiological* studies were done comparing the radiopacity of the treated zones. Besides, a processing image technique was used. This technique generates a pseudo-colour, in which the optical density corresponds to different colours, and a virtual volume in relation with

it. This method is used to visualize the difference in optical density among different zones, related to the mineral density.

The data obtained were analysed *statistically* according to T Student and Mann-Whitney.

**RESULTS:** the ALN and the  $\text{Ca}(\text{HO})_2$  do not interfere in the bone regeneration in any of the experimental times, behaving as bone inductive and bone conductive materials in the “ad-doc” cavity. They also improve the quality of the newly-formed bone tissue with an increase in the trabecular width and in the cellular density by  $\text{mm}^2$  in the new tissue.

The results showed that, with ALN, there are not statistically significant differences in the three experimental times, with regard to the trabecular widths, in relation with their respective controls. Regarding the number of cells by  $\text{mm}^2$  of newly-formed bone surface, significant differences were found ( $p=0.0008$ ) up to the 30 days.

In the group treated with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , it was found that in all the experimental times, the newly-formed trabeculae widths are bigger in the problem-cases than in the controls, showing statistically significant differences ( $p=0.0000$  up to the 7 days,  $p=0.0014$  up to the 15 days and  $p=0.003$  up to the 30 days). On the contrary, the number of bone cells was higher in the control-cases, without statistic differences.

The newly-formed bone tissue in the repaired zone had a radiopacity similar to the normal bone. This was proved radiographically and with the program “Image Pro Plus 4.1-Surface Plot”.

Comparing both materials, it was found that with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , the trabeculae are larger in the three experimental times than with ALN, with statistically significant differences, unlike the number of cells by  $\text{mm}^2$  of the newly-formed bone surface.

**CONCLUSION: The ALN and the  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  are bone inductive and bone conductive materials that improve the quality of the newly formed bone tissue, favouring in this way the bone tissue repair.**

# **INTRODUCCION**

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado, uno de los más resistentes y rígidos del cuerpo humano. Es el componente esencial de los huesos y junto a los tejidos conectivo y cartilaginoso forman el esqueleto de sostén. El tejido óseo cumple funciones de:

- soporte de estructuras blandas,
- protege órganos vitales,
- reservorio mineral del organismo
- interviene en el metabolismo del calcio y el fósforo.
- participa en la actividad hematopoyética ya que la médula ósea es una entidad formadora de células sanguíneas
- junto con los músculos participa en la mecánica de la locomoción

Del tejido cartilaginoso se diferencia particularmente porque posee irrigación e inervación propia, está mineralizado y continuamente presenta recambio por el mecanismo de remodelación. Morfológicamente está constituido por células y matriz extracelular.

## CÉLULAS

\* **Osteoprogenitoras, u osteógenas:** constituyen una población de células madre mesenquimáticas, que tienen capacidad proliferativa, se dividen por mitosis y se diferencian en osteoblastos, son células que tienen por función sintetizar el osteoide, (matriz ósea sin mineralizar) <sup>27-40</sup>

Son células pequeñas, fusiformes, de citoplasma claro, de escaso número de organoides. Se ubican en la porción interna del periostio (membrana que recubre los huesos), y en la médula ósea, pero sin contacto con la superficie del hueso. Según se desarrollen en un ambiente vascularizado o no, puede originar osteoblastos o condroblastos

\* **Células de Superficie, o células de revestimiento:** Forman una capa continua de células aplanadas que revisten los huesos, y pueden estar en estado de reposo, o participar funcionalmente cuando lo requieren los mecanismos de remodelación y formación ósea. En realidad el lugar que ocupan sería un punto de iniciación de la remodelación y luego apoptosis.

Junto con los osteocitos forman una red homeostática, capaz de regular la concentración de calcio en plasma a través de mecanismos independientes de los de la remodelación ósea.

El paso de osteoblastos a CS podría representar el fenotipo final del linaje de osteoblastos, previa a la activación de la secuencia de la remodelación. Son intermediarios entre osteoblastos y osteocitos. Poseen ligera basofilia y escasos organoides. Participan activamente en la nutrición del tejido óseo. Producen factores regulatorios locales como Interleucinas 6 y 11. La superficie donde se las encuentran son entonces sitios primarios de intercambio iones y minerales entre la sangre y el hueso adulto <sup>27-32-40-43</sup>.

**\*Osteoblastos**, derivadas de las células osteoprogenitoras, son los encargados de la síntesis de la sustancia orgánica, tanto colágena como no colágena.

Estructuralmente son células cuboides o redondeadas, ubicadas en la superficie ósea, con citoplasma basófilo y núcleo con cromatina laxa indicadora de su actividad de síntesis. El núcleo se observa en la región celular opuesta a la superficie ósea. Histoquímicamente (técnica de Pas), muestra gránulos citoplasmáticos, probables precursores de las glucoproteínas de la matriz.

Posee prolongaciones citoplasmáticas, que se asocian a osteoblastos vecinos. La sustancia que secretan, se deposita alrededor del cuerpo celular y de sus prolongaciones, luego se mineraliza y forman así las lagunas óseas (osteoplastos) y los canalículos calcóforos respectivamente.

Ultraestructuralmente presentan en su citoplasma los organoides propios de la síntesis y secreción de proteínas, como retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y mitocondrias.

El papel del osteoblasto en la secreción de la colágena ósea, ha sido bien comprobado. Esta matriz recién sintetizada y aún no calcificada, cercana a la célula, se llama osteoide, o prehueso o matriz preósea. Siempre queda una pequeña capa en íntimo contacto con el osteoblasto. Estas células, contienen enzimas, como la fosfatasa alcalina, lo cual sugeriría que están en relación no solo con la elaboración de la matriz, sino también con su mineralización. <sup>5-29-37</sup> Si bien el proceso por el cual la célula secreta sus sustancias es por exocitosis sin compromiso de membranas, a veces ocurre que se eliminan vesículas matriciales rodeadas por membranas al espacio extracelular, participando así en etapas iniciales de calcificación.

La secreción de sustancia matriciales se produce por capas, esta aposición de sustancias y su posterior calcificación, va rodeando al osteoblasto, quedando este encerrado en su propia secreción, y se transforma en osteocito.



Actualmente se reconoce el papel del osteoblasto en el proceso de reabsorción ósea estimulando la diferenciación osteoclástica a través del contacto célula-célula.

Se demostró la presencia de un factor en la membrana de las células osteoblásticas el RANKL, el cual estimula la diferenciación, supervivencia y fusión de las células precursoras de osteoclastos, activa los osteoclastos maduros y prolonga su vida útil. Como resultado permite la expansión de la masa osteoclástica activa capaz de formar sitios de resorción ósea <sup>18-42-65-69</sup>

**\*Osteocitos**, son osteoblastos que quedan encerrados al mineralizarse la matriz orgánica que ellos mismos secretaron. Cuando esto sucede se modifica su intercambio y actividad metabólica y obviamente su fisiología. No tienen capacidad de dividirse o de secretar sustancia orgánica en cantidades apreciables. Tienen citoplasma ligeramente basófilo, contienen gotas lipídicas, algo de glucógeno y vesículas semejantes a los que se hallaban en los osteoblastos, y el núcleo se presenta con cromatina condensada. Son más pequeñas que sus precursores.

Los osteocitos se encuentran en lagunas formadas por matriz calcificada, llamadas osteoplastos. Las prolongaciones celulares se extienden por distancia considerable en los canalículos, que se irradian a partir de las lagunas. En los puntos de contacto entre las prolongaciones osteocíticas dentro de los canalículos, se observan uniones tipo nexus. Esto explica cómo pueden sobrevivir células aisladas de la superficie ósea. Se cree que éste acoplamiento permite el paso de señales, iones y moléculas pequeñas a través de las uniones comunicantes entre las prolongaciones de células vecinas. Este sistema lacuno- canalicular tiene la capacidad de captar y traducir los estímulos mecánicos que actúan sobre el hueso y transformarlos en energía química para transmitir señales a las células efectoras encargadas de la formación y reabsorción óseas. La ubicación estratégica de los osteocitos en el interior de la matriz ósea hace que sean excelentes candidatos para detectar la necesidad de remodelación durante la adaptación funcional a las cargas y de reparar microfracturas,.

**\* Osteoclastos**, son células gigantes multinucleadas, se encuentran en la superficie ósea, cuando hay reabsorción del tejido, y se comportan como macrófagos. Como ellos, se desarrollan a partir de los monocitos circulantes que se originan en el tejido hematopoyético de la médula ósea. Estos precursores son liberados al torrente sanguíneo, y se reúnen en la zona de reabsorción ósea, fusionándose para formar los osteoclastos multinucleados, que se fijan a la superficie de la matriz ósea donde cumplen su actividad resorptiva..

Presentan citoplasma con vesículas, que contienen fosfatasa ácida, enzima presente en los lisosomas, responsables de la eliminación de los restos del tejido óseo producidos durante la reabsorción del hueso. Ultraestructuralmente se observa que en la superficie de la célula que está en contacto con el hueso, prolongaciones citoplasmáticas y microvellosidades, lo que se describe como borde fruncido, borde en cepillo, o borde vellosos, que facilitan la resorción ósea. A los lados del borde vellosos en su citoplasma contiene filamentos de actina que parecen ser los responsables de la fijación de la célula a la superficie del hueso (zona clara). Son las células efectoras del proceso de reabsorción, con capacidad de disolver los minerales <sup>5-18-31-39</sup> por medio de una bomba de protones, y disminuyendo el pH local, como así también hidrolizando la matriz orgánica, a través de las enzimas secretadas por los mismos <sup>19-46-63-67</sup>, estas son colagenolíticas y otras proteolíticas.

### MATRIZ ÓSEA

Está constituida por :

- Una porción inorgánica representada por iones de calcio y fosfato principalmente y en menor proporción bicarbonatos, magnesio, potasio y sodio. El calcio y el fosfato forman los cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10} \text{PO}_4 \text{OH}_2$ ). Estos cristales se disponen a lo largo de las fibras colágenas y están envueltos por la sustancia fundamental amorfa.
- Y una porción orgánica representada en mayor porcentaje por fibras colágenas tipo I (95 %), el resto de componentes orgánicos son colágeno tipo V, proteínas no colágenas, fosfoproteínas y glicosaminoglicanos, siendo una pequeña cantidad de ellos ácidos y sulfatados.

Las fibras colágenas tipo I, presentan periódicamente estriaciones transversales cada 640 Å debidas a la disposición del tropocolágeno. Estos sitios son importantes ya que en ellos se inicia la asociación entre los componentes de la matriz orgánica y los de la matriz inorgánica. Esta asociación de las fibras colágenas y la sustancia fundamental amorfa, con los cristales de hidroxiapatita es la responsable de la dureza y resistencia del tejido óseo. La matriz ósea tiene una apetencia tintorial acidófila, debido al alto porcentaje de fibras colágenas, a diferencia del tejido cartilaginoso que es basófila <sup>5-19-20-27-32-40-43</sup>.

Osteocalcina y osteonectina, son proteínas no colágenas secretadas por los osteoblastos. La osteocalcina es considerada la responsable de la fijación del calcio al colágeno óseo,

también actúa en el reclutamiento de monocitos en los lugares donde es necesaria la remodelación ósea, para conformar osteoclastos. Esta proteína necesita para actuar, cofactores como la vitamina K, C y D. La osteonectina, forma los núcleos de crecimiento de los cristales de hidroxapatita, uniéndose fuertemente a las fibras colágenas y a la hidroxapatita.<sup>5-19-20-27</sup>

El hueso se encuentra constantemente en proceso de remodelación que está regulado por factores locales (ácido araquidónico por ejemplo) como sistémicos (como la hormona paratiroidea, que en concentraciones fisiológicas regula la formación ósea, controlando el metabolismo del calcio y del fósforo). Participan también las citoquinas como las Interleukinas 1 $\alpha$  y 1 $\beta$ , factores de crecimiento, prostaglandinas, proteínas morfogenéticas (con capacidad osteoconductiva) y factores de crecimiento<sup>18-37-38-43-46</sup>. El stress mecánico también actúa en la remodelación, con reabsorción en zonas de presión y aposición en zonas de tracción<sup>63</sup>. Los procesos infecciosos, tumorales, degenerativos, etc., alteran el proceso remodelatorio porque desestabilizan el balance entre el mecanismo de reabsorción y formación ósea. El dinamismo óseo confiere capacidad de remodelación continua<sup>18</sup> como por ejemplo durante el crecimiento del individuo, o en caso de ser lesionado<sup>16-31-41-42-46--68-74-78</sup>

El tejido óseo, está revestido tanto en la superficie interna, como en la superficie externa por una membrana conjuntiva, el endostio y el periostio respectivamente.

El periostio, es una capa de tejido conjuntivo que se aplica sobre la toda la superficie del hueso, excepto en las zonas articulares. Está formado por dos capas, una externa de tejido conectivo denso que se mezcla con el tejido conjuntivo circundante. La capa interna es célula-vascular<sup>5-27-31</sup>

Cuando el hueso se lesiona, las células de la capa interna del periostio se transforman en osteoblastos y restauran el tejido óseo dañado. De allí la importancia en un acto quirúrgico, de preservar la integridad del mismo, para favorecer la posterior regeneración tisular. En condiciones normales, las células de la capa interna (células osteoprogenitoras) permanecen inactivas en el adulto.

El endostio, es una delgada capa de tejido conjuntivo, con células osteoprogenitoras, que reviste la cavidad medular, Estas células, poseen potencial osteogénico y hematopoyético .

De acuerdo a la distribución de los componentes estructurales del tejido óseo, se reconocen dos tipos de hueso: compacto y esponjoso.

Diversas situaciones fisiológicas o patológicas inducen la pérdida de tejido óseo. En tal sentido, se han propuesto diferentes biomateriales y drogas que serían capaces de desencadenar procesos biológicos, para iniciar la recuperación del tejido óseo perdido. .

Tras una lesión, incluidas la extracción de un diente o la instalación de un implante, el hueso puede reconstruirse por medio de procesos fisiológicos de remodelación o cicatrización. En estos procesos pueden incorporarse materiales para favorecer o estimular el crecimiento del hueso como en zonas en las que haya desaparecido como consecuencia de procesos patológicos, traumáticos o fisiológicos. Estos sustitutos óseos pueden actuar sobre el hueso huésped por medio de tres mecanismos diferentes: osteogénesis, osteoconducción, y/o osteoinducción <sup>7-13-18-41</sup>. Algunos autores <sup>41</sup> describen además, como integrante de éstos procesos, la osteopromoción o regeneración ósea guiada; que permite que los espacios reclusos bajo membranas con función de barreras, sea rellenado con hueso nuevo.

### **Osteogénesis**

Es el mecanismo que conduce a la formación del tejido óseo en general y por ende participa en la neoformación ósea (formación y desarrollo de nuevo hueso). Un material es osteogénico cuando promueve la formación y el crecimiento óseo incluso en otros tejidos que normalmente no formarían hueso.

Los materiales de injerto osteógenos están formados por células óseas vivas, que producen grandes cantidades de factores de crecimiento para el hueso. En la actualidad, el hueso autólogo es el único material osteógeno disponible. <sup>16-37-38-41-46-63-66-68-74-</sup>

### **Osteoconducción**

Es un proceso en el cual el material provee un ambiente, estructura o matriz física apropiada para la aposición de hueso nuevo. La osteoconducción caracteriza el crecimiento óseo por aposición, a partir del hueso existente y por encima del mismo. Por consiguiente, se necesita para dicho proceso la presencia de hueso o de células mesenquimatosas diferenciadas.

Consiste en un proceso tridimensional de crecimiento de capilares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras, hacia el defecto óseo, a partir de las paredes del mismo defecto. La osteoconducción, está ligada al empleo de materiales y biomateriales que conforman un entramado que favorece el crecimiento del nuevo hueso.

La cicatrización ósea alrededor de un implante osteointegrado es un proceso osteoconductor y sigue las fases típicas de remodelación a nivel de la interfase hueso-implante.

Los materiales osteoconductivos son biocompatibles. Se pueden desarrollar tejido óseo o tejidos blandos por aposición sobre estos materiales sin que se produzcan signos de reacción tóxica. Los materiales osteoconductivos más utilizados en implantología son productos aloplásticos como por ejemplo la hidroxiapatita <sup>16-37-38-41-46-63-69-74</sup>.

### **Osteoinducción**

Es el proceso que estimula la osteogénesis. Los materiales osteoinductivos pueden estimular la producción de hueso en zonas donde normalmente no se encuentra.

Implica la participación de morfógenos, es decir la conversión fenotípica de células mesenquimáticas indiferenciadas, en células osteoprogenitoras. Esto ocurre en el curso de una cascada biológica, que incluye como pasos claves, la quimiotaxis y la adherencia de células indiferenciadas al material osteoinductor, la proliferación y diferenciación en células cartilaginosas y finalmente en la aparición de hueso y médula ósea <sup>8-9-28-29-41</sup>. Un material osteoinductor es capaz de inducir la transformación de células indiferenciadas en osteoblastos o condroblastos en una zona en la que no cabe esperar dicho comportamiento.. Los más utilizados en implantología son los aloinjertos óseos <sup>16-37-38-41-46-63-69-74</sup>.

En general, podemos señalar que la regeneración ósea requiere de :

\* el aporte de células progenitoras o células con capacidad para diferenciarse en otras formadoras de hueso.

\* la presencia de estímulos osteoinductores para iniciar la diferenciación de las células mesenquimáticas a osteoblastos (materiales que contengan proteínas morfogenéticas).

\* la presencia de un medio osteoconductor sobre el cual el tejido invasor, pueda proliferar y en el cual las células osteoprogenitoras estimuladas, pueda diferenciarse en osteoblastos y formar hueso (materiales porosos, generalmente hidroxiapatita).

Por otro lado, existen materiales que no intervienen como sustitutos óseos pero si mejoran la calidad ósea. Entre ellos encontramos:

### **ALENDRONATOS (ALN)**

Son bisfosfonato de segunda generación, primeros fármacos que no sólo previenen la pérdida de hueso sino que promueve su mineralización. Se trata de un potente inhibidor de la resorción ósea.

Son drogas que se desarrollan como análogos de los pirofosfatos del hueso, que provocan la inhibición de la resorción ósea mediada por osteoclastos y aumentan la densidad ósea. Los bifosfonatos tienen una estructura característica P-C-P que le permite adherirse a los cristales de hidroxiapatita. Al unirse a las sales de calcio, el ALN bloquea la transformación de fosfato de calcio a hidroxiapatita por lo tanto inhibe la formación, agregación y disolución de los cristales del hueso <sup>23-24-30-47-50-51-53-54-55-57-58-59-63-</sup>

A nivel celular en los sitios de reabsorción ósea,, los alendronatos actúan de manera preferencial a nivel del citoesqueleto de los osteoclastos, provocando la pérdida del borde en cepillo, aunque no interfiere en el reclutamiento y adhesión osteoclástica. El mecanismo molecular de estos efectos no es conocido. Además, los macrófagos y los osteoblastos también pueden intervenir en los efectos del alendronato. Se ha comprobado que el fármaco inhibe la producción de interleukina-1 $\beta$  (IL), IL-6 y TNF por los monocitos

El ALN está indicado en el tratamiento y la prevención de la osteoporosis en las mujeres post-menopáusicas y para el tratamiento de la enfermedad de Paget. También está

indicado en el tratamiento de la osteoporosis inducida por corticoides y se está investigando su utilidad en la hipercalcemia asociada como la osificación maligna y heterotópica. se administra por vía oral. La absorción es muy baja, menos de 1% y es despreciable si se administra fármaco menos de dos horas antes del desayuno. Incluso un jugo de naranja o un café pueden impedir que el fármaco se absorba. Los cationes (calcio, magnesio, etc.,) también reducen la biodisponibilidad. La parte de ALN que se absorbe se distribuye en los tejidos blandos, y en el hueso, eliminándose seguidamente por vía urinaria. El alendronato se une en un 78% aproximadamente a las proteínas del plasma. El fármaco no se metaboliza sino que es rápidamente aclarado del plasma, disminuyendo las concentraciones plasmáticas en un 95% en un plazo de 6 horas. Aproximadamente el 50% de una dosis única intravenosa es eliminada en la orina de 72 horas. Una vez fijado al hueso, el ALN queda fijado a este tejido con una semivida de más de 10 años. Sin embargo, el fármaco unido al hueso no es activo en su totalidad ya que la interrupción del tratamiento reduce la inhibición de la pérdida ósea. Se estima que después de 10 años de tratamiento con dosis de Alendronato de 10 mg la cantidad diaria que se libera del esqueleto es aproximadamente el 25% de la dosis absorbida por el tracto digestivo

11- 14-28-47-48-49-50-51-53-56-57-59

### **HIDRÓXIDO DE CALCIO**

Zerbo IR, y col <sup>78</sup>. han demostrado que el fosfato tricálcico es capaz de generar un andamiaje (osteoconducción) sobre el cual encontraron la formación de nuevo hueso y osteoide, en estrecho contacto con las partículas de fosfato tricálcico.

Por otra parte si bien existen abundantes datos bibliográficos respecto a la acción cicatrizante del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , hidróxido de calcio, en el tejido conjuntivo, sus efectos en el proceso de regeneración ósea no se han descrito. Se entiende por regeneración al mecanismo biológico mediante el cual, un tejido lesionado o perdido es reemplazado por un nuevo tejido (neoformado) de características similares o idénticas al tejido original. <sup>11-12-1321-25-30-64-68-78</sup>

Crosa, Scarponi et al. <sup>14</sup>, han descrito que el Hidróxido de Calcio [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] es capaz de inducir la formación de una barrera cálcica en la pulpa dentario de ratas, y promover la formación de una matriz osteoide cuando el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  fue colocado en implantes en el tejido celular subcutáneo

La aplicación del ALN y/o del Hidróxido de Calcio en el tejido óseo podría contribuir a generar conocimientos transferibles al campo de la prevención, tratamiento y rehabilitación de patologías óseas en la clínica.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

**“ El uso local del alendronato y del hidróxido de calcio como relleno de cavidades óseas experimentales promueven la regeneración ósea”.**



## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del Alendronato y del Hidróxido de Calcio en la regeneración tisular de cavidades óseas neoformadas.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Estudiar morfológicamente el efecto del Alendronato en el proceso de reparación ósea en cavidades realizadas en tibia de rata
- Estudiar radiológicamente el efecto del Alendronato en el proceso de reparación ósea en cavidades realizadas en tibia de rata
- Estudiar ancho de las trabéculas neoformadas en el proceso de reparación ósea en cavidades realizadas en tibia de rata tratadas localmente con Alendronato.
- Estudiar morfológicamente el efecto del Hidróxido de Calcio en el proceso de reparación ósea, en cavidades realizadas en tibia de rata
- Estudiar radiológicamente el efecto del Hidróxido de Calcio en el proceso de reparación ósea, en cavidades realizadas en tibia de rata
- Estudiar ancho de las trabéculas neoformadas en el proceso de reparación ósea, en cavidades realizadas en tibia de rata tratadas con Hidróxido de Calcio.
- Comparar el efecto del Alendronato usado localmente con el efecto del Hidróxido de calcio usado localmente, en la reparación del tejido óseo.

## **MATERIALES Y METODOS**

Se trabajó con ratas Wistar machos adultos jóvenes (n=68), con un peso promedio de 200 gr del Bioterio del Instituto de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba-Argentina. Los animales fueron intervenidos quirúrgicamente en sus patas traseras. A cada uno de ellos se le administró anestesia general con una solución de Ketamina y Xilacina (8mg. y 1.28mg. respectivamente por 100 gr. de peso corporal) se depiló la zona tibial y se desinfectó previamente con Cloruro de Benzalconio.

Se realizó una incisión longitudinal con bisturí N° 15 en las patas traseras de animal, dejando expuesta la zona tibial; posteriormente, se decoló disecando la facie subcutánea, los músculos y ligamentos, con el fin de exponer la superficie externa de las tibias, en el área de la diáfisis ósea, según el modelo descrito por Cabrini y col (Laminar test)<sup>6-7-15</sup>.



Fig. 1 Anestesia intraperitoneal

Se realizó una cavidad de 1,5 mm de diámetro, con una fresa de carburo tungsteno redonda de extremo cortante (N°6), mediante rotación manual para prevenir el sobrecalentamiento del hueso, con el probable daño tisular. Este tratamiento en cada animal se realizó en la zona diafisiaria de ambas tibias.



Fig. 2 Tallado de cavidad en la tibia con instrumental manual



Fig. 3 Cavidad tallada en el hueso

Los animales fueron divididos en dos grupos según el siguiente diseño experimental:

**Grupo 1:** la cavidad ósea fue rellenada con Alendronato en polvo (0,1mg / 100gr de peso corporal) agregado al sangrado generado por la intervención quirúrgica. (n=32)

**Grupo 2:** las cavidades talladas fueron rellenadas con Hidróxido de Calcio purisimum, en polvo, agregado al sangrado propio de la intervención (n=32)

En todos los casos una cavidad tibial de la pata izquierda es rellena con el material propuesto según el grupo al que pertenece el animal, y la cavidad de la pata derecha es su respectivo control, sin relleno alguno.

Realizadas las intervenciones quirúrgicas, se reposicionaron los tejidos por planos en posición, se suturaron las heridas con hilo reabsorbible. Los animales son tratados según normas de asepsia y no se administrará tratamiento farmacológico alguno. Los mismos son mantenidos en jaulas con dieta balanceada y agua ad libitum, durante el período del tiempo experimental. El tratamiento de los animales se realiza respetando las normas del Acuerdo de Helsinki para el trabajo sobre animales. El mantenimiento de los animales se realizó también en el Bioterio del Instituto de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba-Argentina



Fig. 4 Sutura cutánea

## **ANÁLISIS RADIOGRÁFICO**

Se tomaron radiografías pasado los tiempos experimentales, evaluando las mismas cualitativamente <sup>4</sup>. La radiografía fueron tomadas con equipo radiológico dental (Stident) con un rendimiento de 10MA 60 Km. . Se utilizaron placas radiográficas Kodak (dentales periapicales) de 40 mm por 30 mm. Para identificar la pata problema y diferenciarla de la pata

control, a la primera se la marcó con un instrumental metálico para que se identifique la radiopacidad en la película.

Se utilizó el Programa Image Pro Plus- Surface Plot: es una técnica de procesamiento de imágenes bidimensionales, que genera un pseudocolor que corresponde a la densidad óptica que tiene su correspondencia con la densidad mineral. Se representa en colores vivos (rojo-naranja) las zonas de mayor densidad, y con colores fríos (azul-verde) las zonas de menor densidad óptica. También, se genera un volumen virtual en relación a la densidad óptica, en imágenes tridimensionales, visualizando con diferentes relieves las distintas zonas según la densidad.

Previo a sacrificar los animales se controló si presentaban alguna alteración a nivel de los tejidos blandos y la facies muscular.

Los animales fueron sacrificados por inhalación de éter a los siguientes tiempos posquirúrgicos: 0, 7, 15, 30 días, donde se procedió a resecar las tibias que fueron fijadas en solución de formol taponado al 10%, pH 7, desmineralizadas con solución de Acido Nítrico al 7% y procesadas para su posterior inclusión en parafina.

## **ANÁLISIS MORFOLÓGICO**

Las tibias desmineralizadas e incluidas, fueron procesadas y coloreadas con Hematoxilina Eosina, y el método tricrómico de Masson. El procesamiento del material se realizó en el laboratorio de las Cátedras de Histología y de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Córdoba.

Las observaciones microscópicas, la toma de fotomicrografías, el análisis morfométrico y el análisis estadístico, se realizaron en el Área de Biología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba-Argentina.

## **ANÁLISIS HIGROSCÓPICO**

Se analizó también la capacidad higroscópica de los materiales de relleno (o sea la capacidad de absorber o ceder humedad al medio) colocando tanto el Alendronato como el Hidróxido de calcio en un tubo de ensayo y en un recipiente de vidrio (Vaso Dappen). Se los

hidrató con solución fisiológica y se mantuvieron en estufa a 37° centígrados (temperatura corporal), se controló si los mismos aumentaban de volumen a los 30 minutos, a la hora, a las dos horas y a las veinticuatro horas. En los primeros controles no presentaron modificación alguna, y a las 24 horas el material había reducido su volumen. Esto se realizó para descartar el posible aumento de volumen de las drogas que podrían provocar modificación en la zona pericavitaria y en los tejidos blandos vecinos.



Fig. 5 ALN en un tubo de ensayo



Fig. 6 Se le incorpora solución fisiológica hasta cubrirlo por completo.





Fig.7 Se marca el nivel para controlar

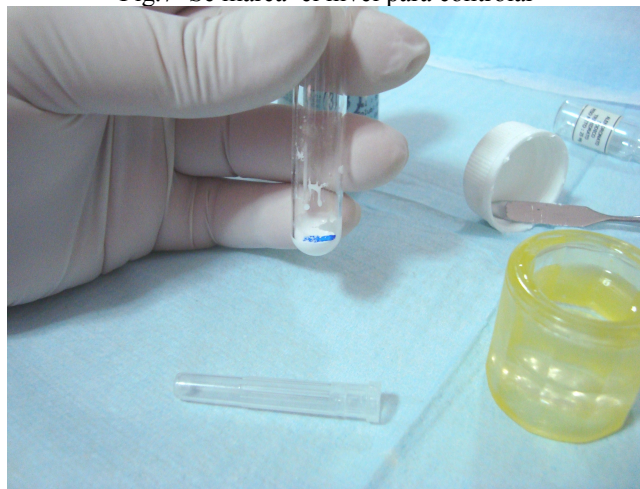


Fig. 8 Control a la hora



Fig. 9 Colocación de hidróxido de Calcio en tubo de ensayo



Fig. 10 Se hidrata con solución fisiológica hasta su saturación.



Fig. 11 Se marca el nivel para control

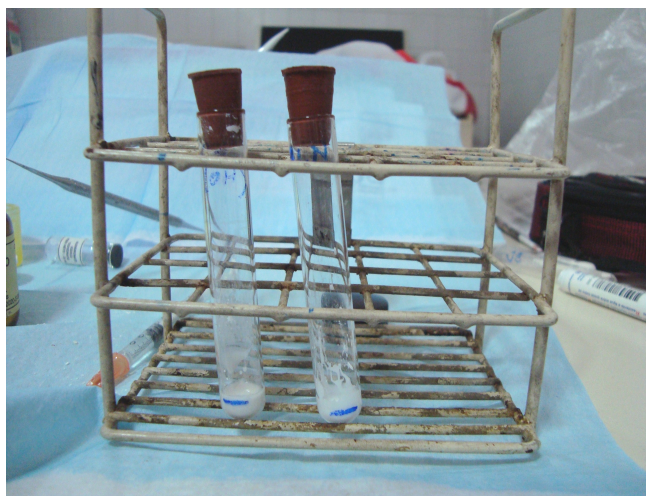


Fig. 12 Los tubos se mantuvieron en estufa a 37°C



Fig. 13 El procedimiento se realizó también en vasos Dappen.



Fig. 14 Material hidratado con solución fisiológica.





Fig. 15 Mezclado para homogeneizar

## ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Se midió el ancho de las trabéculas óseas neoformadas y se cuantificó los elementos celulares del tejido óseo neoformado, mediante un analizador de imagen según el programa: “Image Pro Plus 4.1”.

El procesamiento consta de:

\* Medición del ancho de las trabéculas óseas neoformadas de los preparados descalcificados y teñidos posteriormente con Hematoxilina Eosina (HE) y observadas a 200X (objetivo de 20X). Se consideró ancho máximo, ancho mínimo y promedio de una serie de mayor a 12 valores en el mismo preparado.

Se analizó diez (diez) casos de cada grupo y su respectivo control, y de cada tiempo experimental, totalizando más de 120 (ciento veinte) mediciones de anchos trabeculares por cada tiempo experimental y en cada grupo de trabajo, (se tomaron un total de 1974 mediciones)

\* Recuento de número de células por  $\text{mm}^2$  de superficie ósea. Se analizó igual número de casos que para anchos trabeculares.

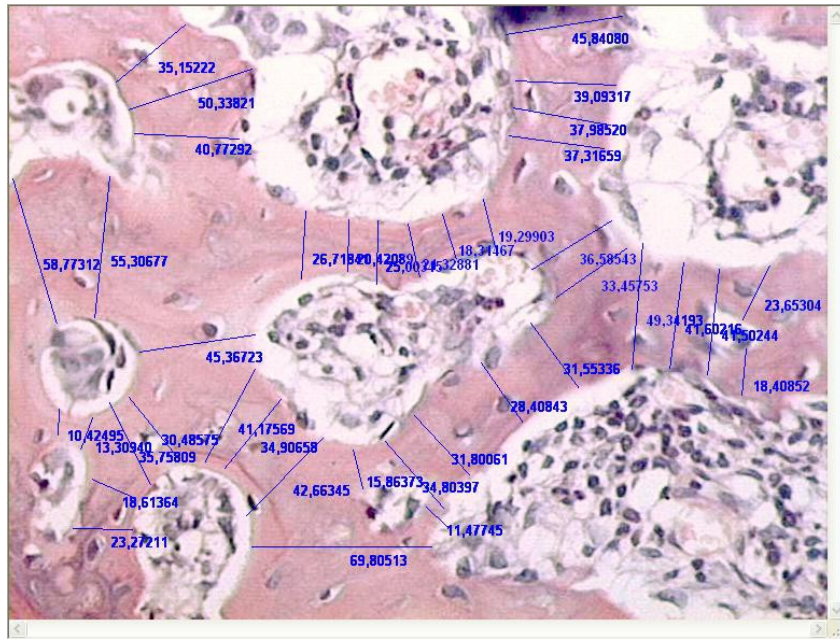


Fig. N° 16 preparado histológico donde se muestra como se realizaron las mediciones de los anchos trabeculares para su posterior análisis estadístico

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizaron gráficos comparando los promedios de las diferentes mediciones realizadas en cada preparado, tanto para anchos trabeculares como para número de células por  $\text{mm}^2$  de superficie ósea. En el grupo ALN y su control, y en el grupo Ca(OH) y su control en los distintos tiempos experimentales. Además se realizó gráficos comparando los distintos tiempos experimentales de cada grupo, y gráficos comparativos de los 2 grupos entre sí.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente según T Student y Mann-Whitney. Se realizaron gráficos comparando en los distintos tiempos experimentales cada caso problema con su respectivo control y entre los distintos tiempos experimentales entre sí. Como así también se comparó gráficamente los dos materiales entre sí en los distintos tiempos experimentales.

## **RESULTADOS**

## **RESULTADO HIGROSCÓPICO**

Al analizar la capacidad higroscópica del Alendronato (ALN) y del Hidróxido de calcio [  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ], se comprobó tanto el ALN como el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  reducían el volumen, por lo que se descarta que pudieran alterar la cicatrización superficial.



Fig. N° 17 Control a las 2 horas donde se observa disminución del volumen del material

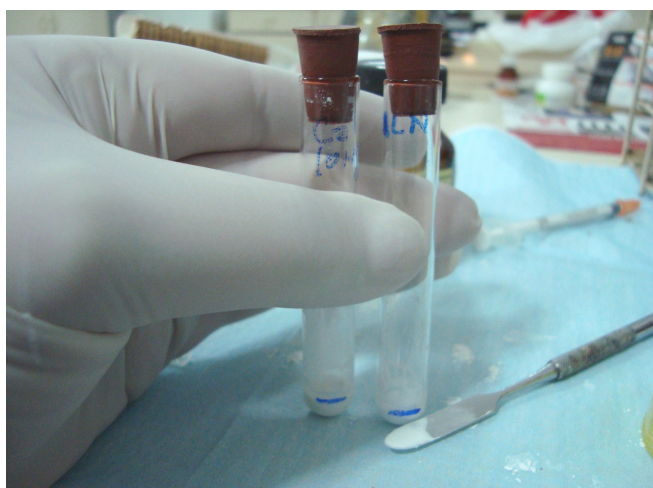


Fig. N° 18 Control de los tubos a las 24 horas





Fig. Nº19. Control 24 horas. Notable disminución del volumen

Al observar las ratas en diferentes tiempos post-quirúrgicos, no se apreció inflamación como tampoco infección en la zona quirúrgica. Como así también los tejidos blandos circundantes a la cirugía no mostraron alteración alguna, en los dos grupos experimentales.

## **RESULTADOS MORFOLÓGICOS**

### **Grupo 1: ALENDRONATO**

#### **Día 0:**

**Grupo Control:** Solo se observó la cavidad tallada vacía rodeada tanto de tejido óseo compacto como medular normal.

**Grupo experimental :** se aprecian partículas del material de relleno en la cavidad, y no se evidencia modificación alguna en el tejido circundante (Fig N° 20)

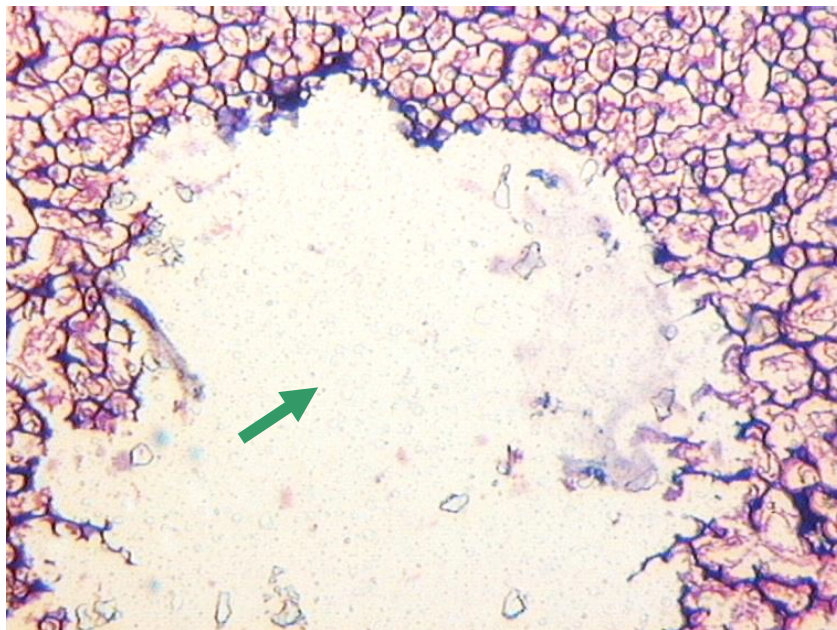



Fig. N° 20.- Día 0 Tallado cavitario en la parte central de la tibia .  
Coloración HE 100x

## **7 Días:**

**Grupo control:** se aprecia médula ósea normal 100x, trabéculas óseas con líneas incrementales de calcificación. (Fig N° 21)

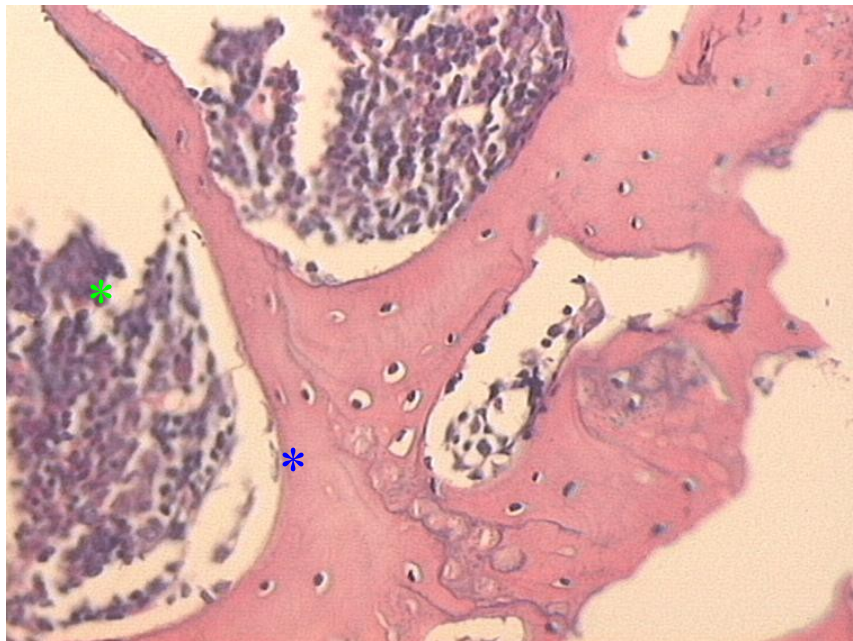


Fig. 21.- ALN control 7 días. Médula (\*), trabéculas óseas (\*).  
Coloración HE 200x

**Grupo Problema:** en una vista panorámica (Fig. N° 22) observamos la porción de la tibia correspondiente a la zona tratada, la médula ósea y la cortical. En la región medular cercana al tallado cavitario se visualiza un tejido reaccional, donde se aprecia un infiltrado

linfoplasmocitario y un aumento del número de capilares. Estas observaciones se confirman a una magnificación mayor de 400x (Fig. N° 23)

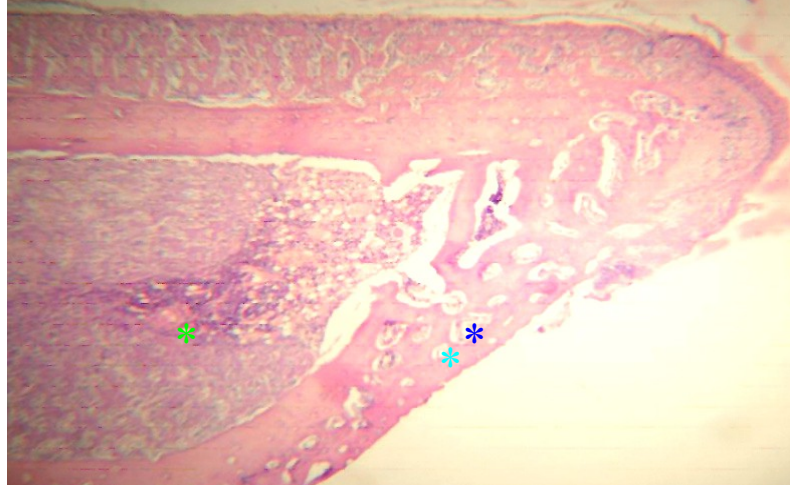


Fig N° 22 En la imagen panorámica es notorio el infiltrado celular en la zona medular cercana al tallado cavitario realizado (\*), se visualiza claramente el relleno, por hueso compacto poco organizado (\*) con grandes vasos sanguíneos en la zona tallada experimentalmente(\*).Preparado coloreado con HE, 40x.

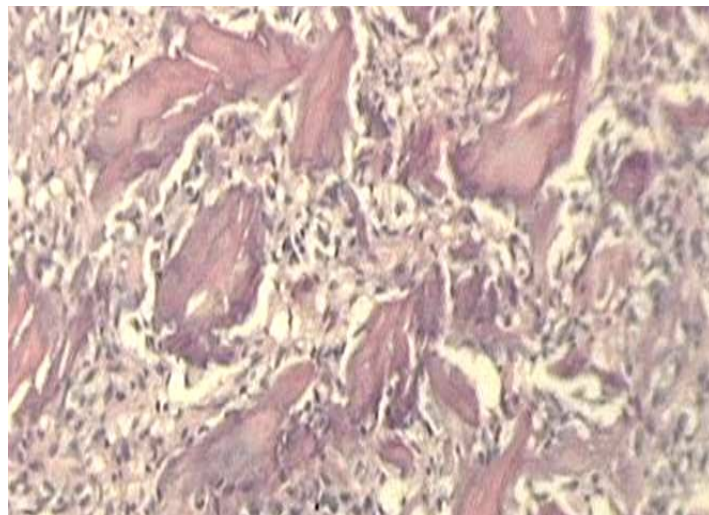


Fig. 23. Médula ósea. ALN 7 día . A mayores aumentos se confirma el infiltrado celular con trabéculas irregulares distribuidas al azar . Coloración HE. 200x



En la zona cortical donde se talló la cavidad se observa un tejido óseo aún no organizado que indica una reparación tisular. A mayor aumento (200x) en la zona medular más profunda se destaca la presencia de trabéculas óseas y gran número de fibras colágenas (Figura N° 24). En las trabéculas encontramos osteocitos con su cromatina condensada en sus correspondientes osteoplastos que en algunos casos se presentan amplios. Además se aprecia matriz osteoide acidófila, y en la misma observándolas a mayor aumento se evidencian líneas incrementales de calcificación. En la periferia de las trabéculas es posible observar células de superficie. ( Fig 25 y 26 ) e importantes vasos sanguíneos dilatados.

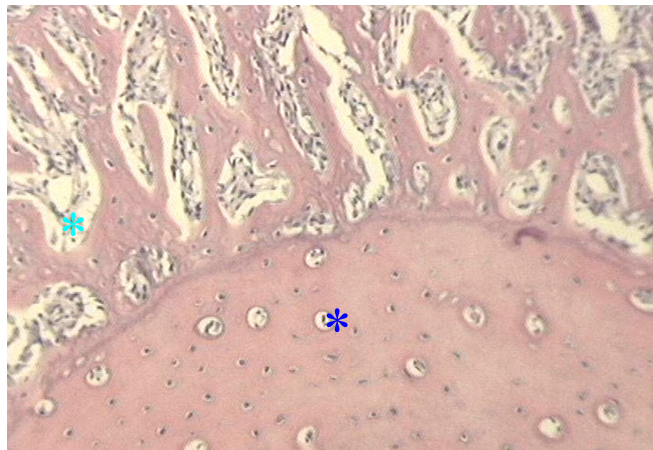


Fig 24 ALN 7 días Microfotografía del límite entre la zona de reparación cavitaria y el tejido vecino no afectado por las maniobras quirúrgicas..En la primera zona, observamos una distribución irregular de las trabéculas óseas(\*) poco organizadas, con infiltrado inflamatorio entre ellas. En la segunda, por el contrario, observamos tejido óseo compacto regularmente distribuido (\*) y organizado. Coloración HE. 100x

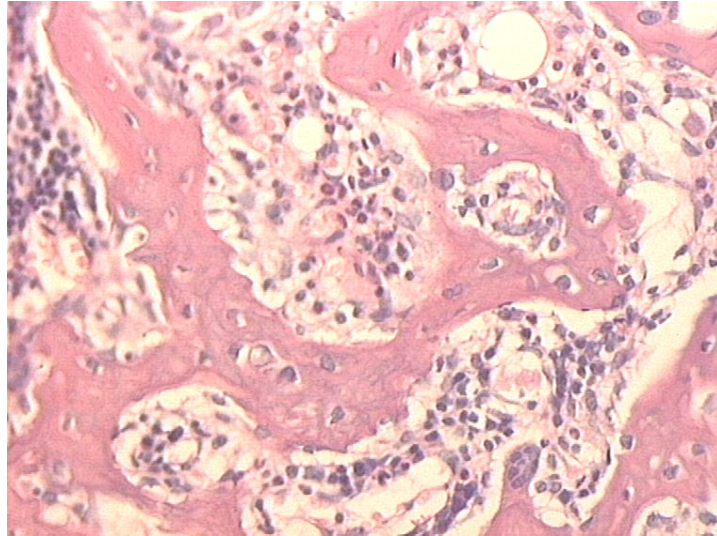


Fig N° 25 Alendronato 7 días control zona de regeneración. A ésta magnificación se observa con claridad, las trabéculas óseas reparativas, con alta densidad de osteocitos, células de superficie, y un infiltrado intertrabecular Coloración He 200x

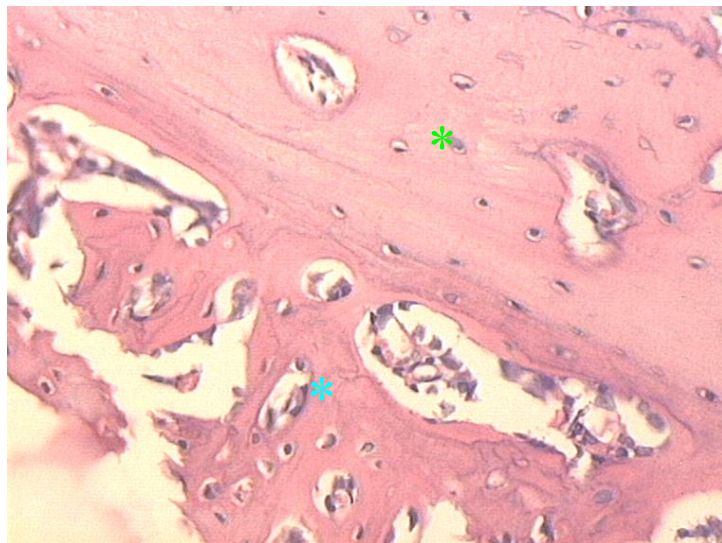


Fig 26. ALN 7 días Problema. Se observa el tejido óseo neoformado en la zona donde se realizó la cavidad (\*) experimental, en contacto con el el tejido óseo pericavitario. (\*) .Coloración HE 400x



**15 Días:**

**Grupo control:** se observa hueso trabecular reparativo con líneas incrementales bien notorias y tejido medular normal. (fig N° 27)

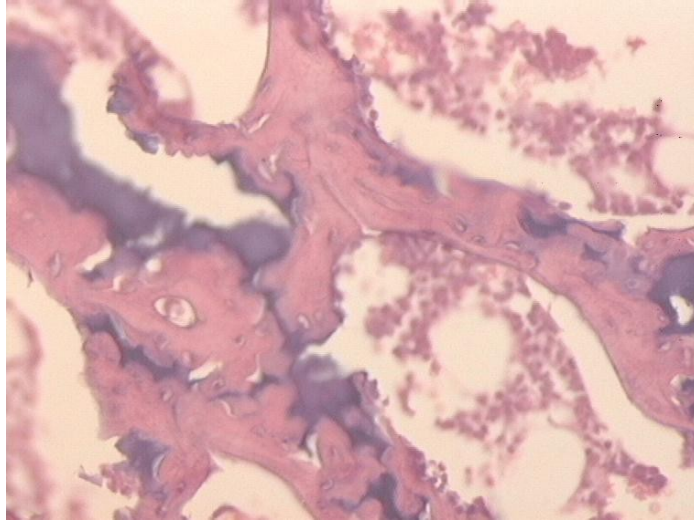


Fig N° 27, 15 días control 200X HE

**Grupo problema:** observamos que el tejido medular presenta células hematopoyéticas, vasos sanguíneos y células grasas, también se visualiza un tejido óseo cortical con trabéculas óseas (Fig 28 y 29).

En la zona de reparación además de las típicas trabéculas de hueso reaccional normal observamos núcleos de tejido cartilaginoso. (Fig N° 30- 31 y 32) En la misma se puede apreciar matriz osteoide con vasos sanguíneos, prolongaciones citoplasmáticas y algunas líneas incrementales. (Fig N° 33). Además, se puede observar en la zona de reparación, la presencia

\*

\*



de núcleos de tejido cartilagosos.

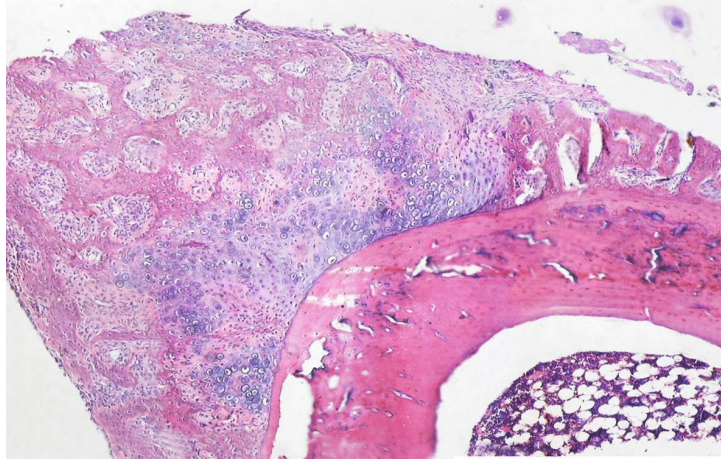


Fig 28 Vista panorámica ALN 15 días problema.  
Es notoria la presencia de núcleo de tejido cartilaginoso (\*).adyacente al hueso compacto pericavitario (\*). Se observan trabéculas óseas y tejido medular. 40x. HE

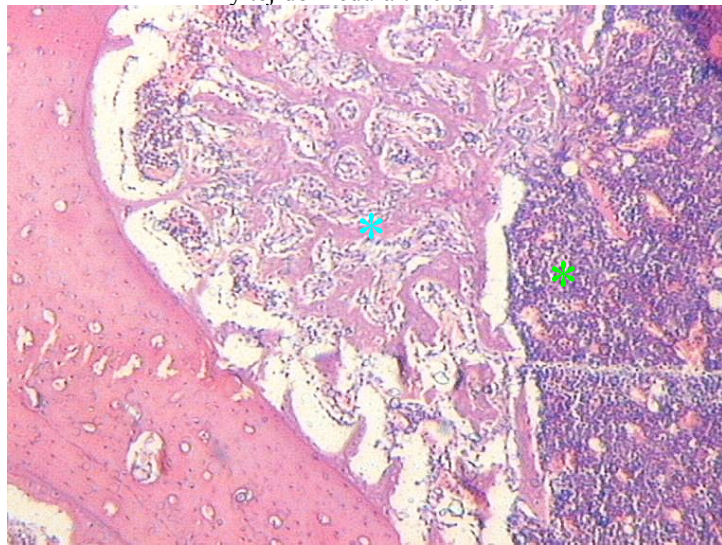


Fig. N°29. ALN 15 días. Zona cortical y Medular.  
Observamos infiltrado inflamatorio en la zona medular (\*)  
adyacente a las trabéculas óseas recién formadas (\*)  
100x. Coloración HE

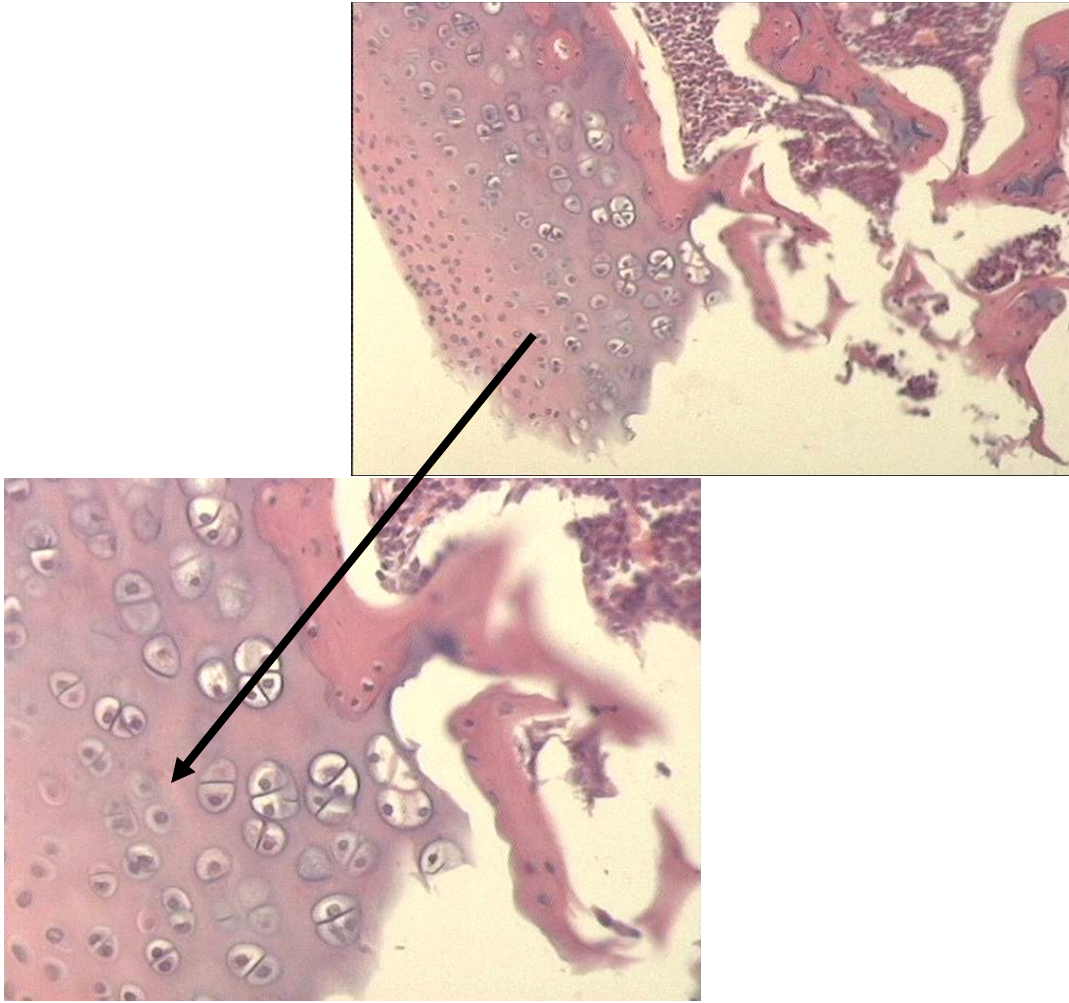


Fig N°30 ALN 15 días Zona de regeneración. Se observa el tejido cartilaginoso. 100x y 200x. Coloración HE. .

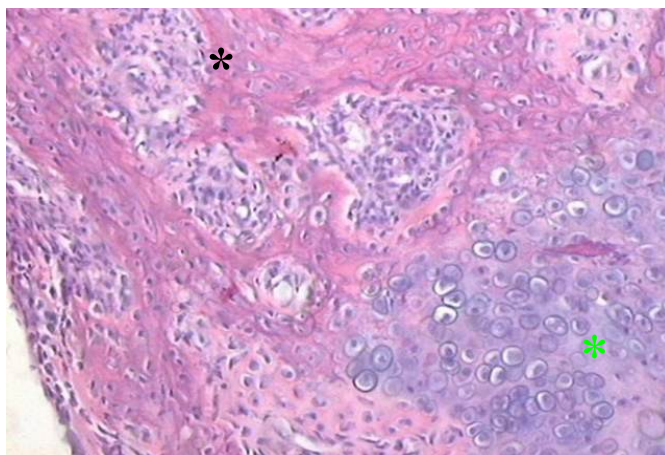


Fig N° 31 ALN 15 días. Núcleos de cartílago (\*) y trabéculas óseas (\*) con gran número de células, HE 100x

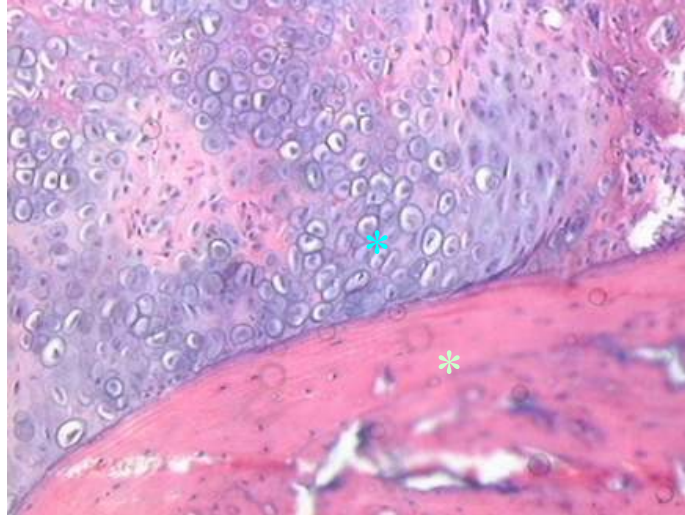


Fig N° 32 ALN 15 días. Núcleos de cartílago (\*), adyacente al tejido óseo vecino a la zona tratada (\*). HE 200x

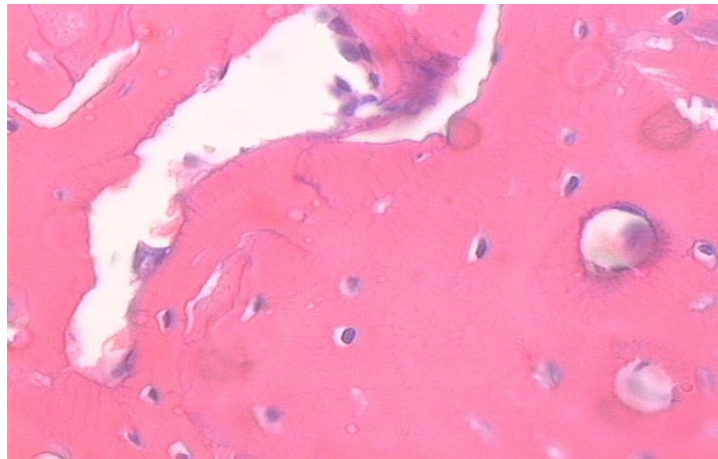


Fig N° 33 ALN 15 días. Tejido óseo con vsos se puede apreciar matriz osteoide con vasos sanguíneos. días Coloración HE 400x



### **30 Días:**

**Grupo Control:** La cicatrización cavitaria se visualiza con un tejido óseo trabecular normal al igual que el tejido medular. Fig N° 34 y 35

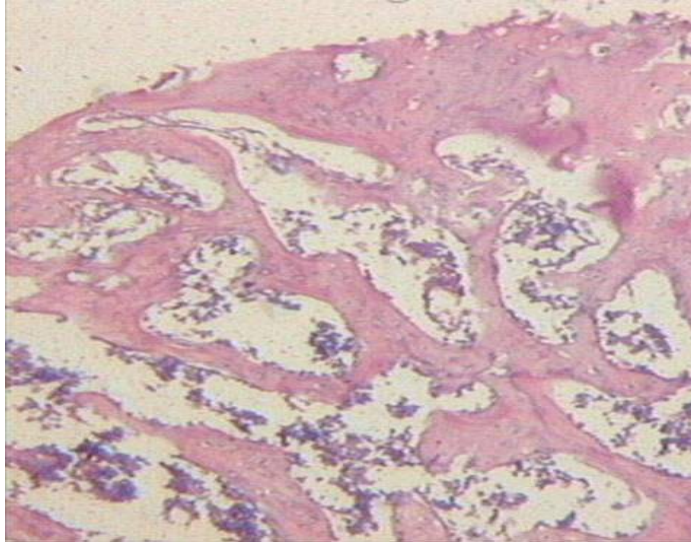


Fig. N° 34 ALN días control. Cortical . Se observa tejido óseo poco organizado. Coloración HE. 100x

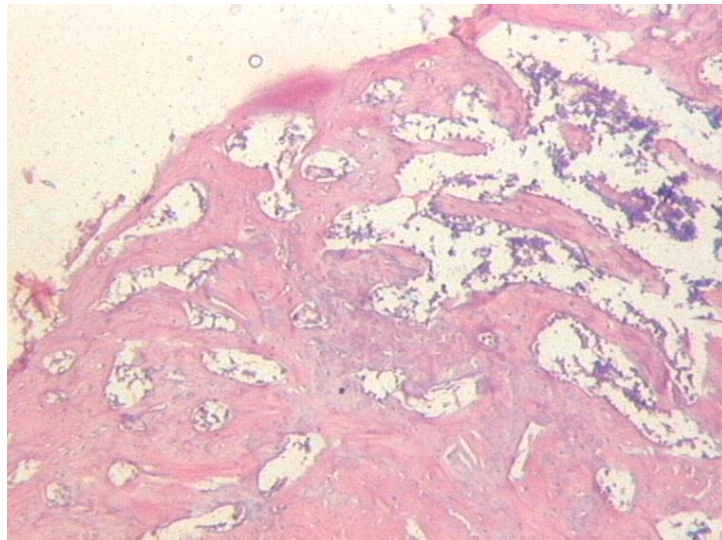


Fig. N° 35 ALN Control 30 días , zona de reparación.

Coloración HE 100x .

**Grupo Problema:** El aspecto más notorio a este tiempo experimental es observar inmediatamente por fuera de la cortical en la zona reaccional las características histológicas típicas de la osificación endocondral: cartílago normal, seriado, hipertrofiado, calcificado y erosionado. También se observan zonas de depósito osteoide acidófilo sobre espículas de cartílago calcificado basófilo.

Otros detalle que merece ser destacados es que a medida que el proceso de osificación endocondral va progresando el hueso trabecular se organiza en Sistemas de Havers típicos del tejido óseo compacto. Entre ellos quedan incluidos restos de cartílago. Además el periostio está organizado y cubriendo la superficie tallada.

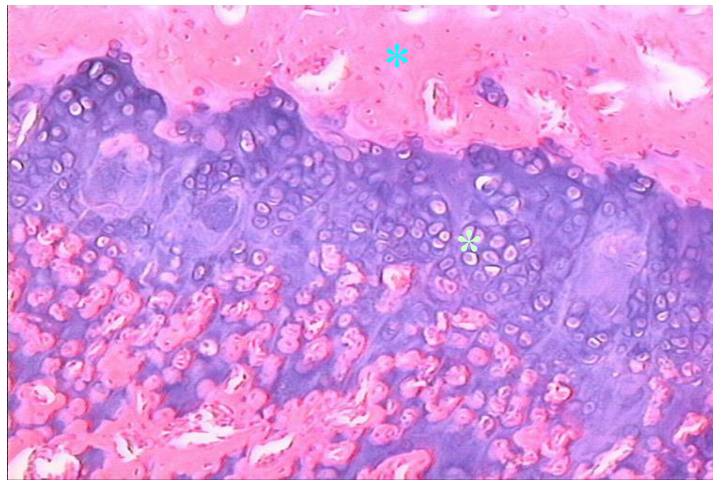


Fig. N° 36 ALN 30 días en ésta microfotografía podemos visualizar, en la zona de reparación. formación osteoide ( acidófila) a partir del proceso de osificación endocondral ( ) ( se observan todas las zonas de éste proceso ). La zona vecina que no fue tratada experimental, entre presenta las características típicas de hueso compacto (\*).HE. 200x .

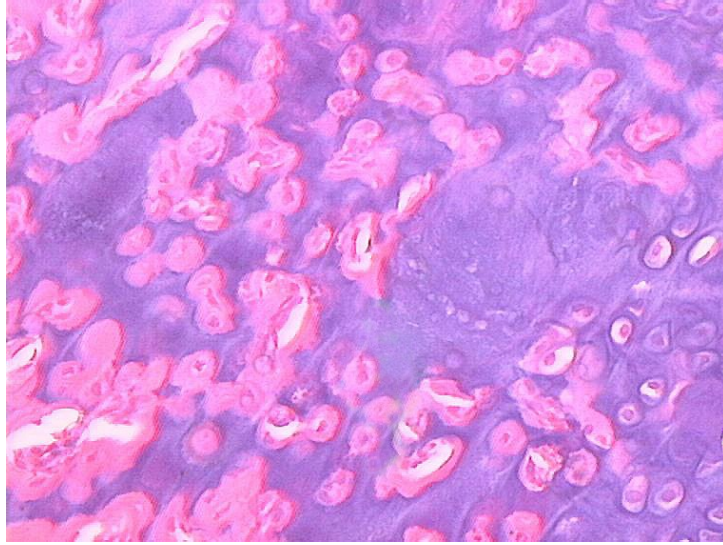


Fig.Nº37 ALN 30 días. Se observan zonas de depósito osteoide acidófila sobre espículas de cartilago calcificado basófilo. . HE 400x

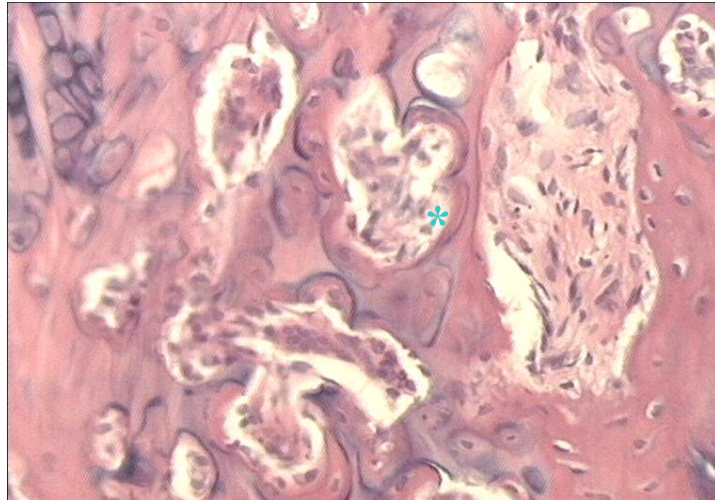


Fig. Nº 38 ALN 30 días observan zonas de depósito osteoide acidófila sobre espículas de cartilago calcificado basófilo.(\*). HE 200x



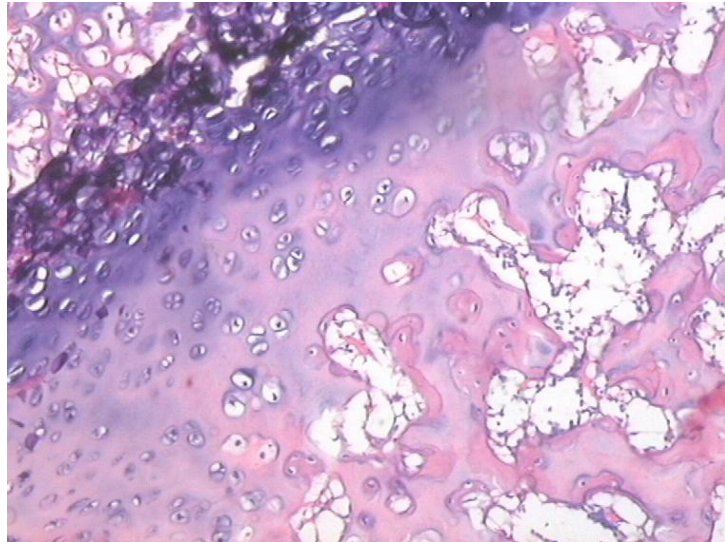


Fig. N° 39 ALN 30 días Se observa el proceso de osificación endocondral y hueso trabecular . HE 100x

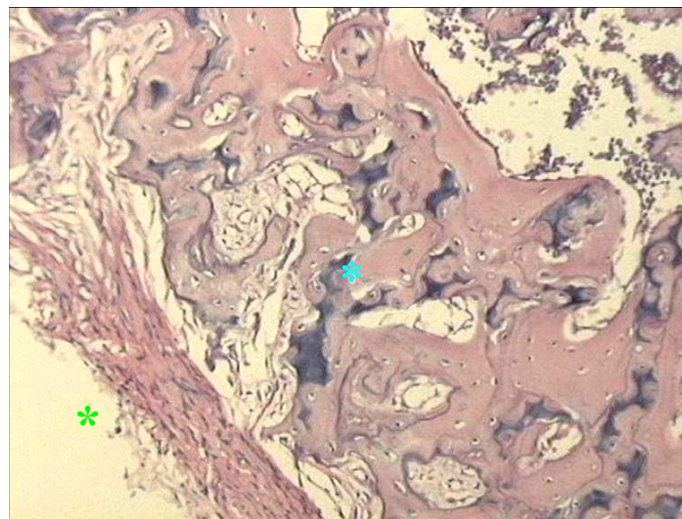


Fig. N°40 ALN 30 días problema. Cortical El hueso trabecular se organiza en Sstemas de Havers (\*) típicos del tejido óseo compacto. Se observa el periostio regenerado (\*) 100x HE

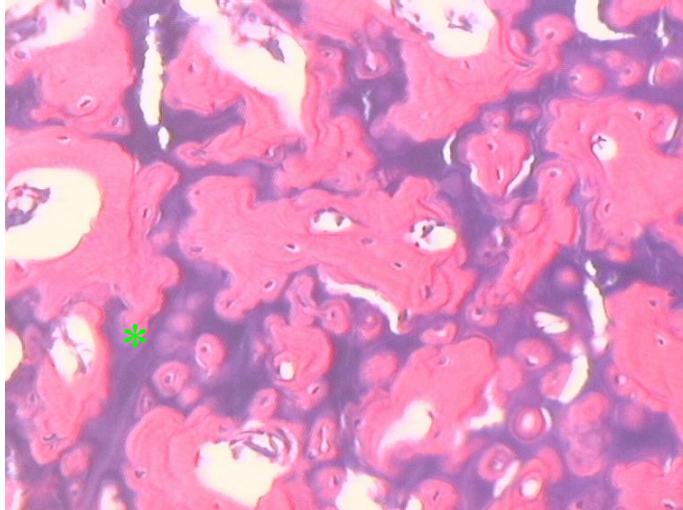


Fig. N° 41 ALN 30 días Coloración HE. 200X Cortical, Se observa líneas de cementación y restos de tejido cartilaginoso (\*).

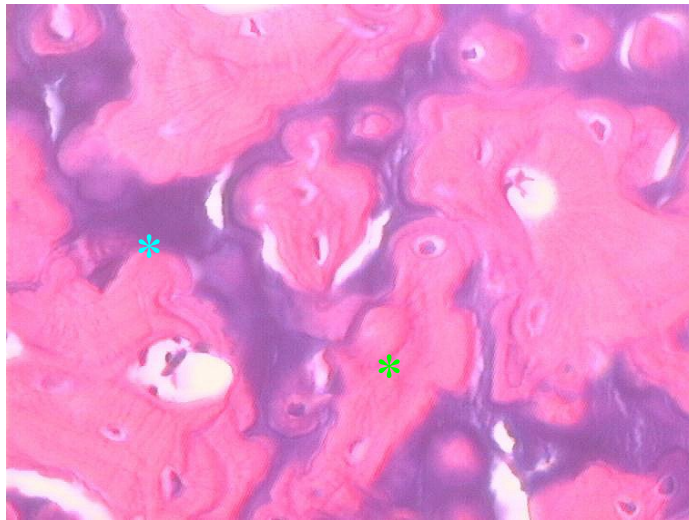


Fig. N° 42 ALN 30 días Se observan líneas de cementación (\*) y restos de tejido cartilaginoso (\*) Coloración He 400x

## GRUPO 2 : HIDRÓXIDO DE CALCIO

### Día 0 :

**Grupo Control:** Se observan tejidos tanto óseo como medular normales y la cavidad tallada vacía.

**Grupo Experimental:** Se visualiza la cavidad tallada con restos del material de relleno, rodeado por tejidos normales. (Fig N° 43)



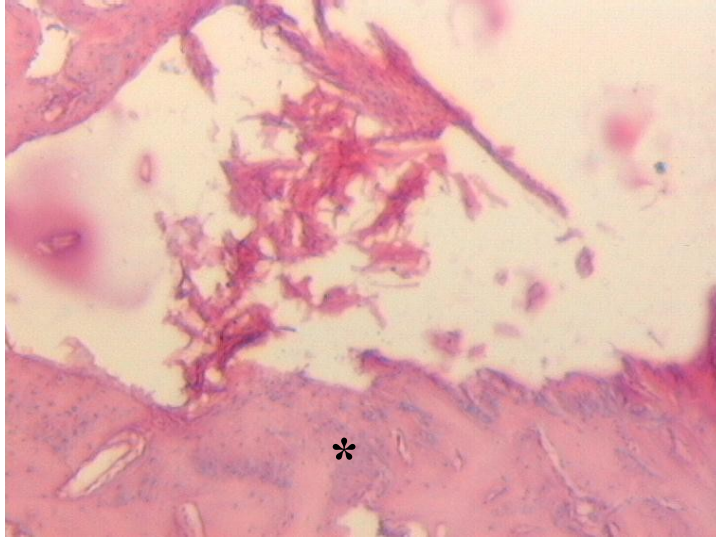


Fig. N° 43 Cavity. Día 0. Hidróxido de Calcio  
Se observa el tejido óseo pericavitario (\*)  
Coloración HE. 200x

**Día 7:**

**Grupo control** : se observó un tejido óseo trabecular reaccional con gran densidad celular y el tejido medular con gran infiltrado linfo- plasmocitario y un aumento de la vasodilatación. (Figuras N° 44,45)

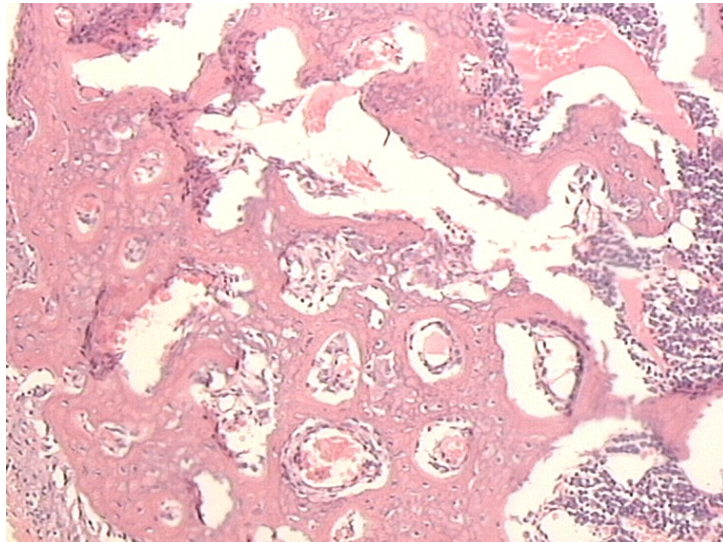


Fig. N° 44 Hidróxido de calcio 7 días , control. Zona donde se realizó la cavidad, formación de tejido óseo trabecular. Coloración HE 100x

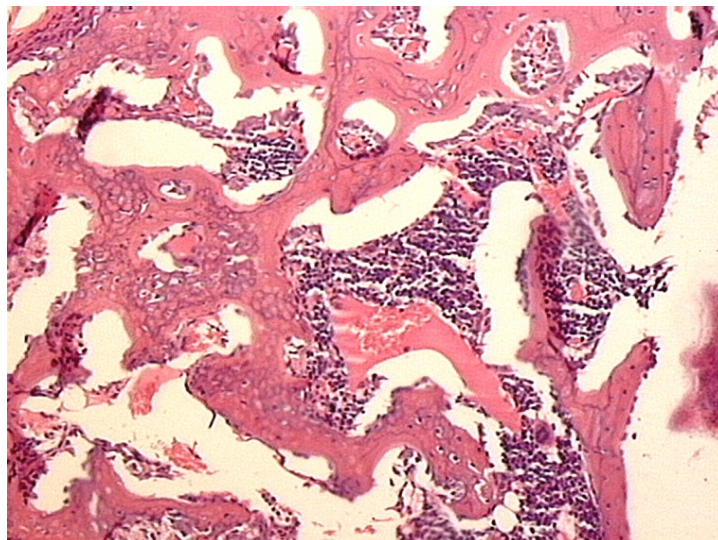


Fig. N° 45 Hidróxido de calcio 7 días control  
Hueso trabecular . Coloración HE 100x

**Grupo Problema:** En la zona de tallado cavitario se observa una gran cantidad de hueso trabecular reaccional con gran densidad celular, con la técnica de Masson podemos apreciar una gran densidad de fibras colágenas en su estructura (Fig N° 49). También se aprecia una población celular de la médula que varía; en la zona cercana a la cavidad este tejido tiene un aspecto similar a lo normal con fibrosis colágena, y en las zonas más alejadas predominio de un infiltrado linfoplasmocitario y una intensa vasodilatación (Fig N° 46 y, 47, 48)

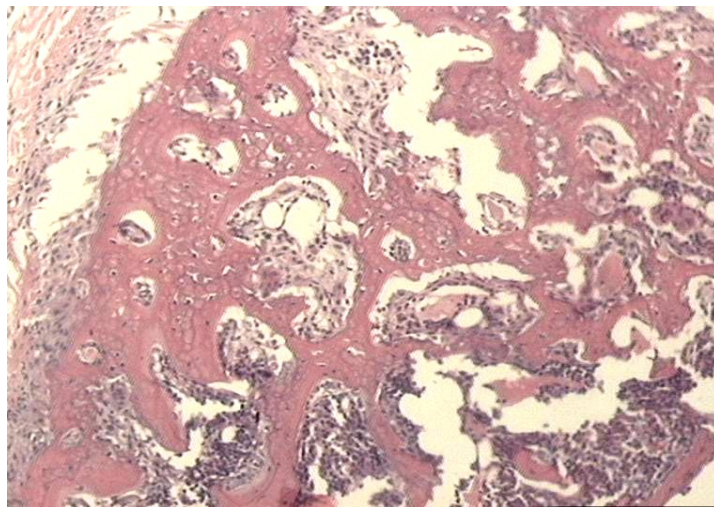


Fig. N° 46. Hidróxido de Calcio. 7 días caso problema Coloración HE 100x

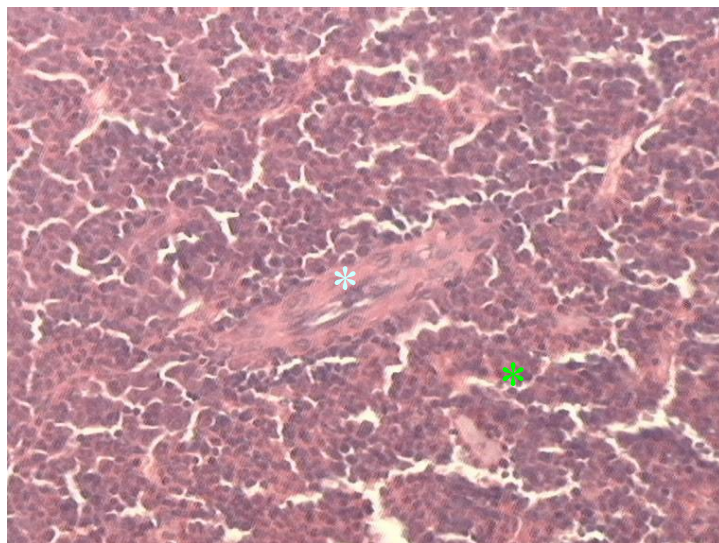


Fig. N° 47 Hidróxido de Calcio. caso problema 7 días.  
Médula ósea se observa infiltrado



Inflamatorio (\*) y vasos sanguíneos ( ) Coloración HE 200X

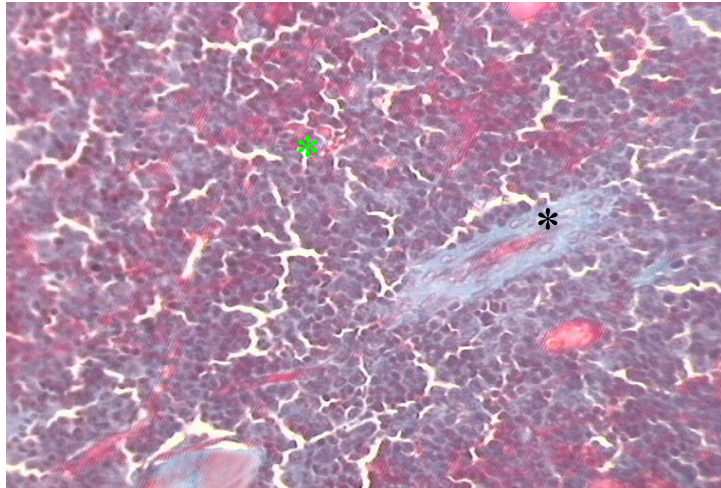


Fig. N° 48,- Hidróxido de Calcio. problema 7 días  
Médula ósea (\*) vasos sanguíneos(\*). Coloración Masson 100x

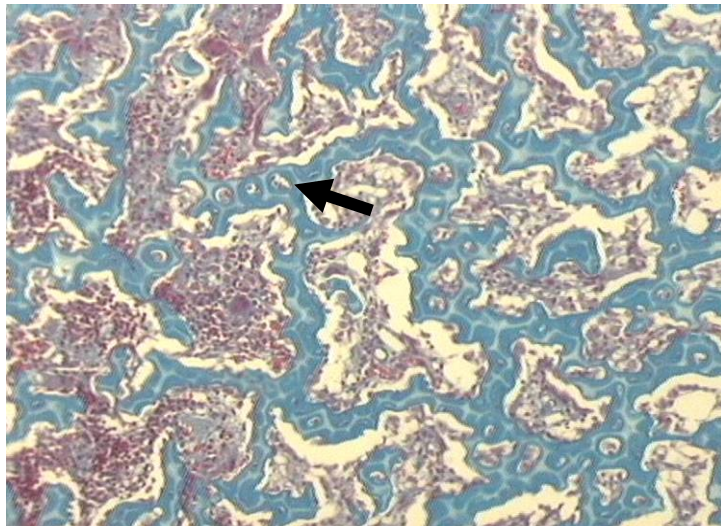


Fig. N° 49 Hidróxido de Calcio 7 días., caso problema.  
Zona de reparación, en azul se observan  
las trabéculas óseas Coloración Masson 100x.

**Día 15:**

**Grupo Control:** Se observa la zona cavitaria rellena con tejido óseo trabecular que en la zona más periférica presenta una tendencia a la organización de hueso compacto, con una disminución en la celularidad, pero con un aumento en el tamaño lacunar. La médula presenta un aspecto normal . (Fig N° 50). Se observan restos de material basófilo dentro de las trabéculas.

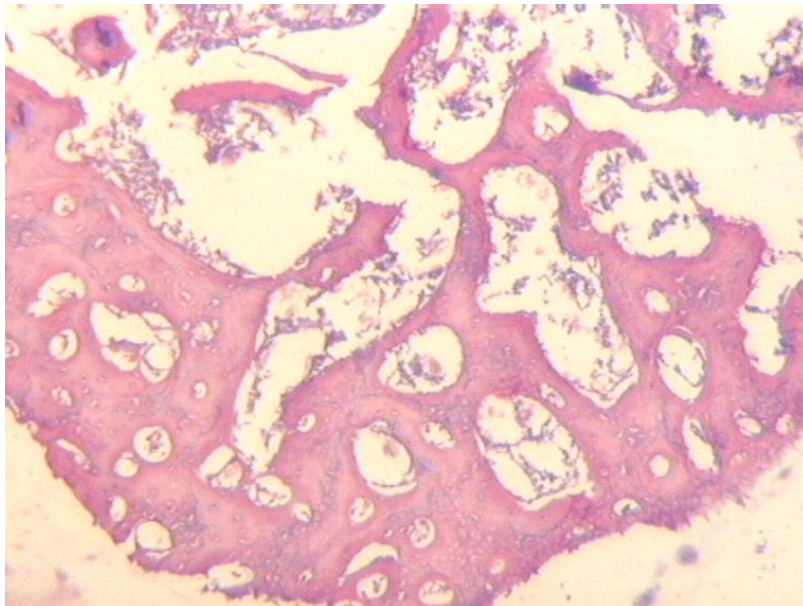


Fig. N° 50 Hidróxido de Calcio 15 días Control  
Porción cortical de zona reparativa., hueso poco organizado. . HE 100 x

**Grupo Problema:** Observamos imágenes típicas de osificación endocondral en la zona de reparación que culminan con cartilago erosionado, a continuación se visualizan trabéculas óseas sintetizadas sobre restos de tejido cartilaginoso calcificado. ( Fig N° 51 y 52).

En zonas más superficiales el tejido óseo neoformado tiende a adoptar una organización estructural de hueso compacto, presentando en algunas zonas sistemas de Havers pequeños (Fig N°56) y en otras las células de las trabéculas tienden a orientarse concéntricamente (Fig N° 54 y 55). El tejido medular evidencia signos de infiltrado linfo plasmocitario con una gran vascularización. ( Fig. N° 53).

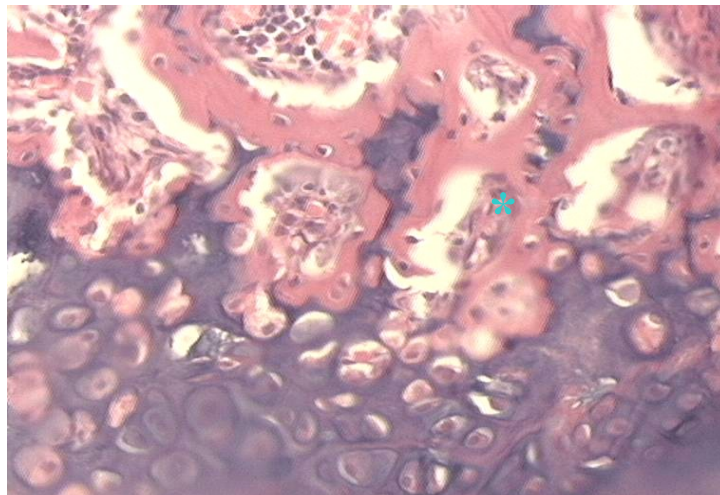


Fig. N° 51 Hidróxido de Calcio 15 días problema.  
Se observa las capas de la osificación endocondral  
Y las típicas trabéculas ósea acidófilas (\*).Coloración HE 200 x



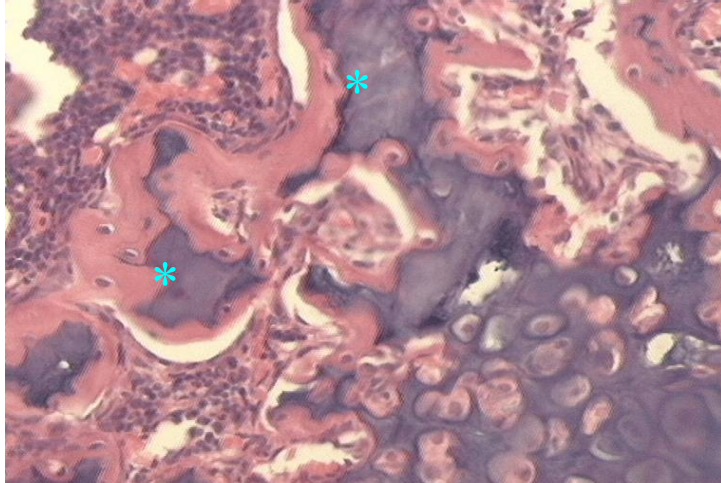


Fig. N° 52 Hidróxido de Calcio 15 días. Problema.  
Se observan las trabéculas óseas con restos de

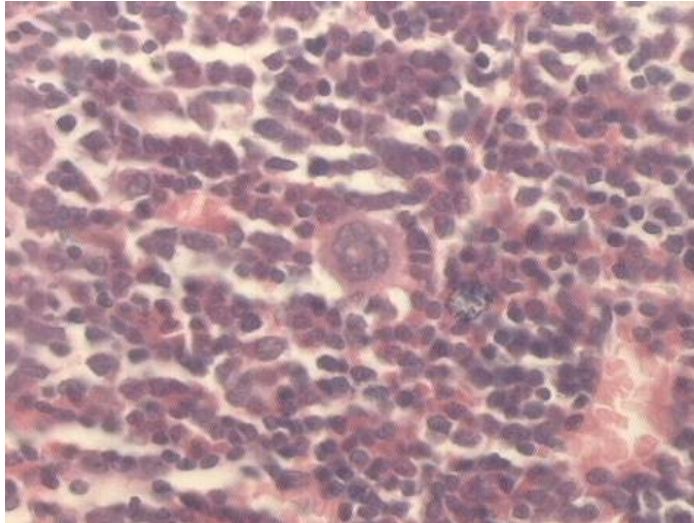


Fig. N°53 Hidróxido de Calcio 15 días Médula .Infiltrado  
Inflamatorio y vasos sanguíneos. Coloración HE 200X

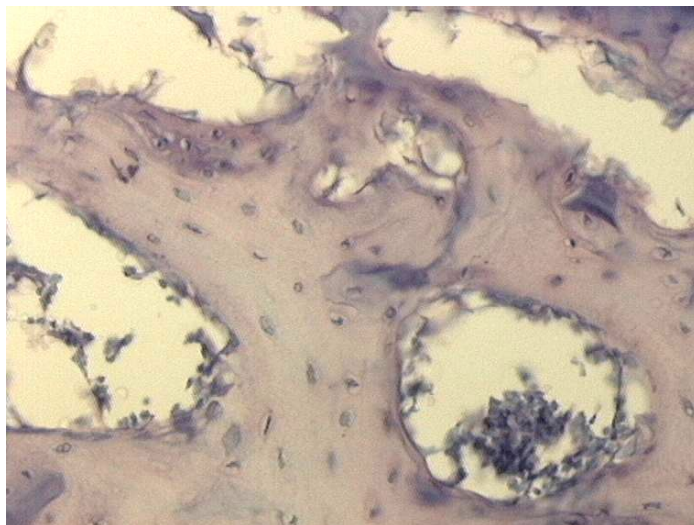


Fig. N° 54 Hidróxido de Calcio 15 días. Problema.  
Trabéculas óseas y tejido medular. Coloración HE 400 x.

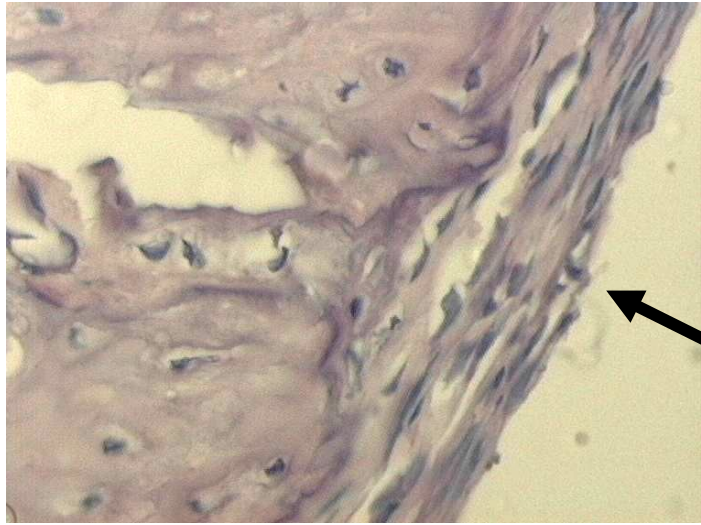


Fig. N°55 Hidróxido de Calcio 15 días. Se observa es periostio regenerado. Coloración HE 400x

**Día 30:**

**Grupo Control:** se observa tejido óseo trabecular con gran celularidad y restos basófilos dentro del mismo, y un tejido medular con un aspecto normal pero con una gran cantidad de células adiposas. ( Fig. N° 57)



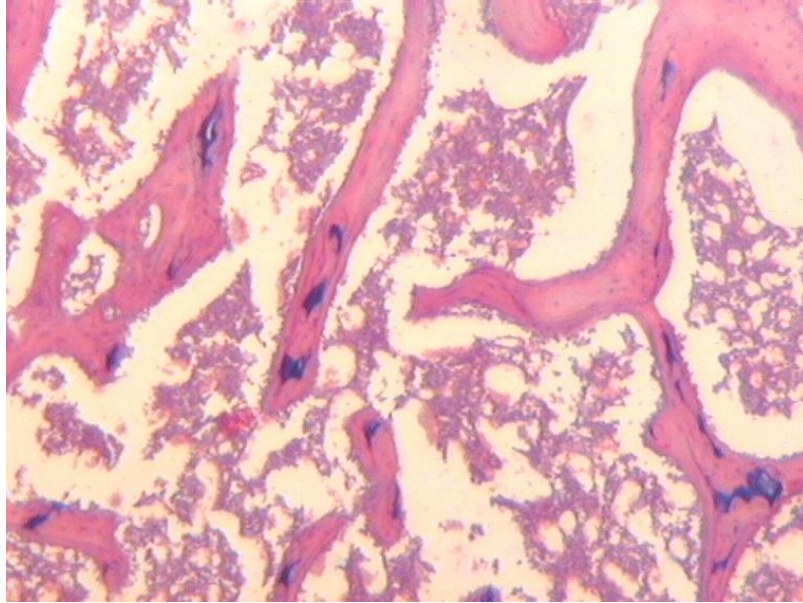


Fig. N° 57 Hidróxido de Calcio 30 días Control.  
Trabéculas óseas y tejido medular. En la médula se observa gran  
cantidad de tejido adiposo. Coloración HE 100x

### **Grupo Problema :**

Se observa hueso laminar con gran densidad celular, líneas incrementales y núcleos cartilaginosos dentro de ellas, y al igual que en los controles zonas basófilas acelulares. La médula se presenta muy vascularizada y con células grasas e infiltrado linfocitario. ( Fig. N° 58)

También se puede apreciar el aspecto típico de la osificación endocondral y la zona osteoide acidófila que se deposita sobre los núcleos de cartílago calcificado basófilo. ( Fig N° 59 y 60)

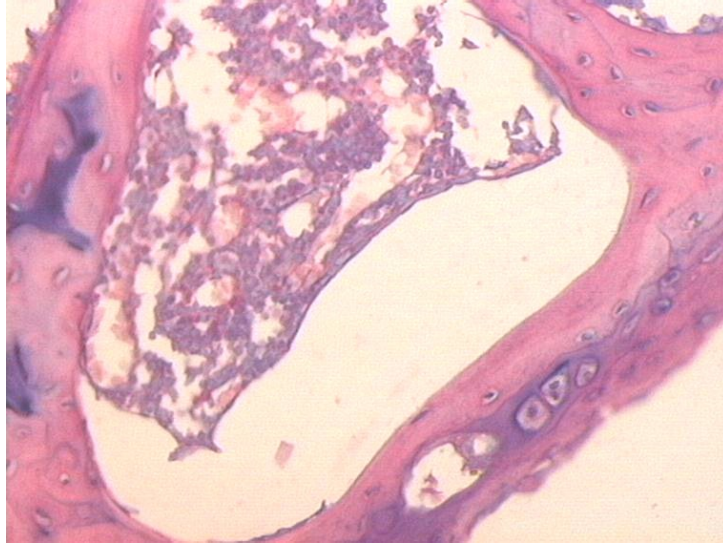


Fig. N° 58 Hidróxido de Calcio 30 días. Se observa trabécula ósea con resto de tejido cartilaginoso y médula ósea con infiltrado inflamatorio y médula ósea. Coloración HE 100 x.

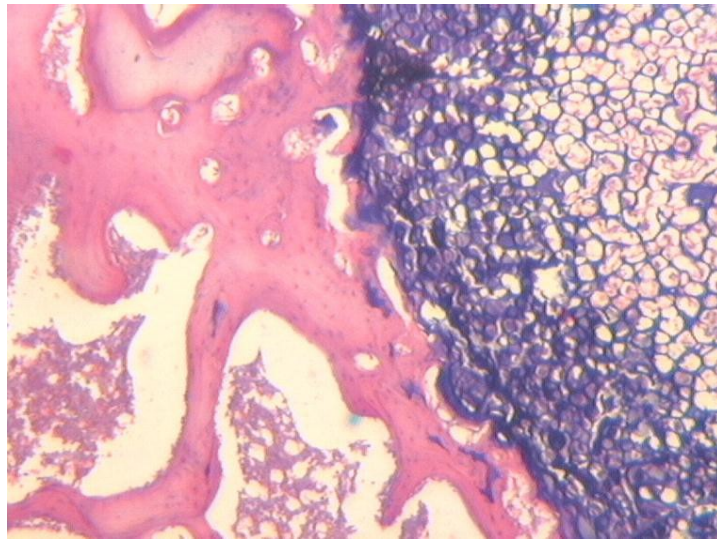


Fig N° 59 Hidróxido de Calcio 30 días. HE. 100x

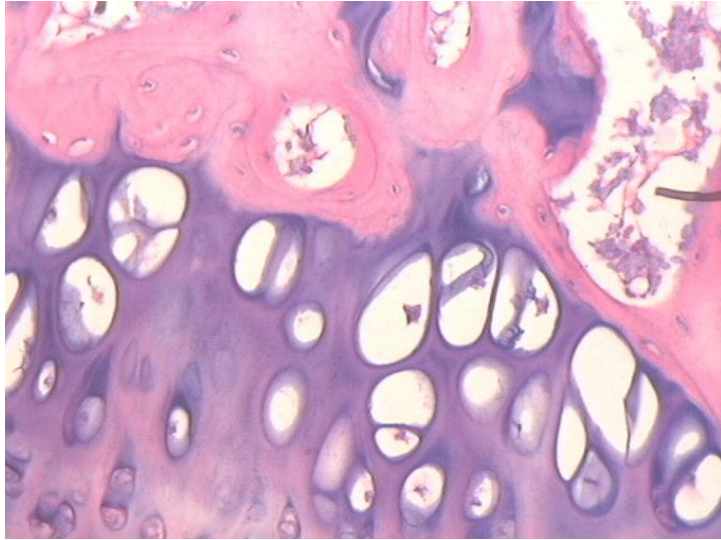


Fig.N° 60 Hidróxido de Calcio 30 días . 200X HE Se observan las últimas etapas del proceso de osificación y trabéculas óseas con resto de tejido cartilaginoso.

## ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS Y ESTADÍSTICOS

### Mediciones de anchos trabeculares y número de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea

#### Grupo ALENDRONATO

##### 7 días :

Se observa que el grupo problema presenta un ancho trabecular promedio, mayor que su respectivo control. El número de células por mm<sup>2</sup> de superficie también fue mayor en el grupo problema que en el control. (Tabla 1 y 2 - Fig. N° 61 y 62). Tanto con la prueba de T Student como con el de Mann-Whitney no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en este tiempo experimental, entre ALN y sus respectivos controles. (Tabla 3)

Problema ALN 7 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
ALN (1)	40,50	60,81	15,46	14	9.871,75	1.418
ALN (2)	39,38	57,95	13,58	20	14.904,23	1.342
ALN (3)	44,28	71,48	20,92	23	16.702,85	1.377
ALN (4)	36,71	52,10	22,89	6	3.762,24	1.595
ALN (5)	45,28	93,07	20,35	57	26.876,01	2.121
ALN (6)	37,91	70,43	9,49	25	17.329,92	1.443
ALN (7)	33,23	69,81	10,42	27	18.674,60	1.446
ALN (8)	41,24	54,52	26,59	20	9.121,58	2.193
ALN (9)	59,66	109,72	15,69	52	31.682,91	1.641
ALN (10)	26,41	47,37	6,24	14	11.226,65	1.247
<b>Promedios</b>	<b>40,46</b>	109,72	6,24			<b>1.582</b>

Tabla 1 Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada-. ALN 7 días casos problemas

Control CTR 7 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
CTR (1)	43,57	77,65	15,03	18	10.560,80	1.704
CTR (2)	30,63	41,10	15,86	12	8.765,63	1.369
CTR (3)	41,76	76,80	11,56	25	15.650,41	1.597
CTR (4)	27,34	46,65	13,91	21	14.026,99	1.497
CTR (5)	32,63	56,55	19,64	18	11.882,11	1.515
CTR (6)	30,20	54,43	16,20	21	11.084,33	1.895
CTR (7)	37,21	72,30	16,65	18	12.498,10	1.440
CTR (8)	45,73	75,80	25,76	8	8.505,42	941
CTR (9)	46,60	76,26	7,67	32	20.347,36	1.573
CTR (10)	46,17	76,80	22,50	14	10.885,41	1.286
<b>Promedios</b>	<b>38,18</b>	77,65	7,67			<b>1.482</b>

Tabla 2 Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. ALN a los 7 días casos controles

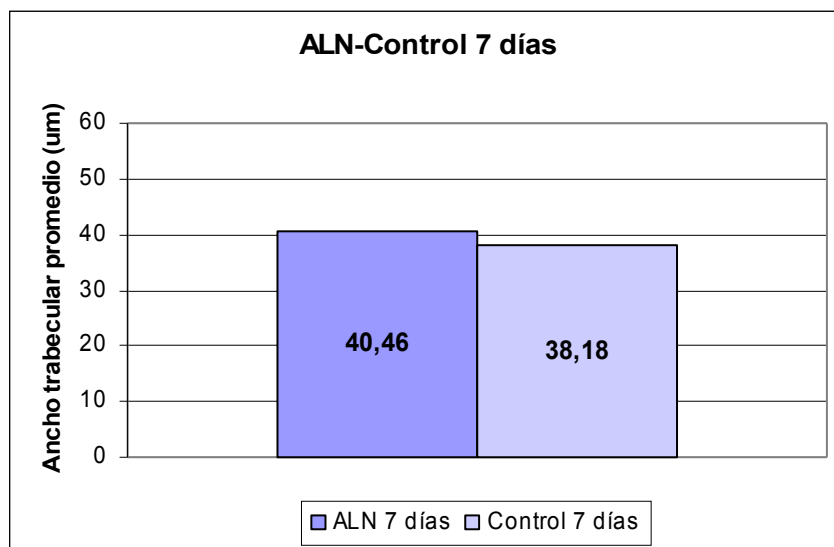


Fig N° 61 Ancho trabecular promedio de Grupo ALN problema y control a los 7 días.

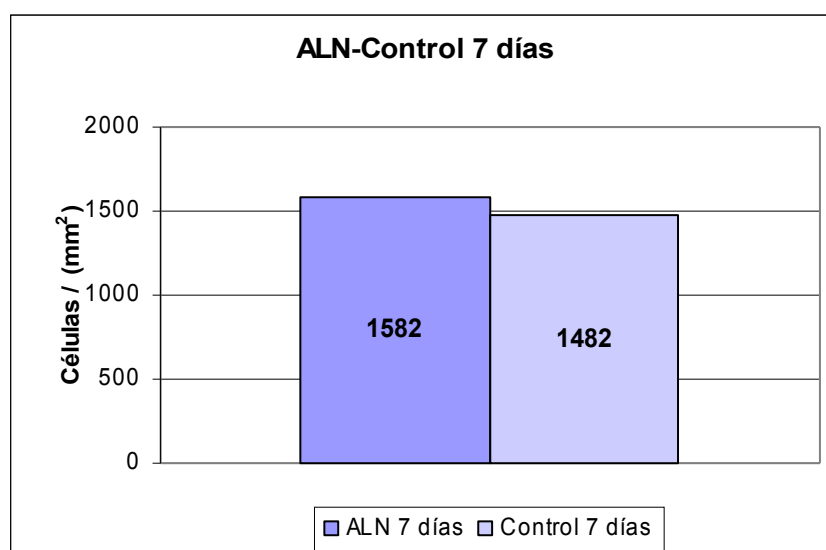


Fig. N° 62 Número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabecular en grupo ALN problema y control. Tiempo experimental: 7 días

### Test de Student (prueba de muestras independientes)

7 días	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias		95% Intervalo de confianza para la diferencia
Inferior	Superior	Inferior						Superior	Inferior	Superior
Aln - Ctrl(A)										
Ancho trabecular	0,124	0,725	-0,52	318	0,6058	-1,13	2,19	-5,45	3,18	
Células por mm <sup>2</sup>	0,634	0,436	0,77	18	0,4507	100,60	130,48	-173,54	374,74	

Tabla 3 Análisis estadístico test Student, donde no presenta diferencias estadísticamente significativas en el ancho trabecular y en el N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea, a los 7 días post-tratamiento, en el grupo ALN, entre los casos problemas y controles

## ALN 15 días

Se observó que en cuanto al ancho trabecular, el grupo problema presenta mayor promedio de los ancho trabecular que los respectivos controles. No siendo así en cuanto al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie, que si bien hay muy poca diferencia, es mayor en el grupo control que en el grupo problema (Yablas 4 y5, Fig N° 63 y 64), no hay diferencias estadísticamente significativas en éste tiempo experimental entre ALN y sus respectivos controles

Problema ALN 15 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
ALN (1)	73,02	75,04	17,77	24	14.979,58	1.148
ALN (2)	31,14	48,35	12,93	48	30.614,53	1.568
ALN (3)	33,93	65,34	8,59	46	38.308,17	1.201
ALN (4)	45,59	60,27	26,40	29	35.943,93	807
ALN (5)	37,31	69,88	14,75	25	28.269,17	884
ALN (6)	26,78	39,18	15,86	19	11.519,75	1.649
ALN (7)	29,51	39,58	13,55	18	15.236,98	1.181
ALN (8)	29,03	67,61	9,18	22	10.440,82	2.107
ALN (9)	26,13	52,51	4,86	12	14.229,55	843
ALN (10)	60,46	108,02	42,45	69	31.754,06	2.173
<b>Promedios</b>	<b>39,29</b>	108,02	4,86			<b>1.356</b>

Tabla 4 Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. ALN 15 días, casos problemas

Control CTR 15 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
CTR (1)	20,54	32,30	12,34	30	21709,88	1.382
CTR (2)	33,91	59,22	12,31	25	14.687,64	1.702
CTR (3)	35,87	61,78	9,82	17	15.535,62	1.094
CTR (4)	38,15	56,70	17,76	19	18.378,34	1.034
CTR (5)	35,54	53,04	12,36	25	20.507,30	1.219
CTR (6)	35,72	51,77	14,50	37	26.409,95	1.401
CTR (7)	32,91	50,99	5,78	33	22.578,12	1.462
CTR (8)	44,43	62,95	24,18	32	20.577,45	1.555
CTR (9)	25,12	44,38	13,17	24	17.527,63	1.369
CTR (10)	35,99	56,06	14,17	19	13.213,29	1.438
<b>Promedios</b>	<b>33,82</b>	62,95	5,78			<b>1.366</b>

Tabla 5 Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. ALN 15 días, casos controles

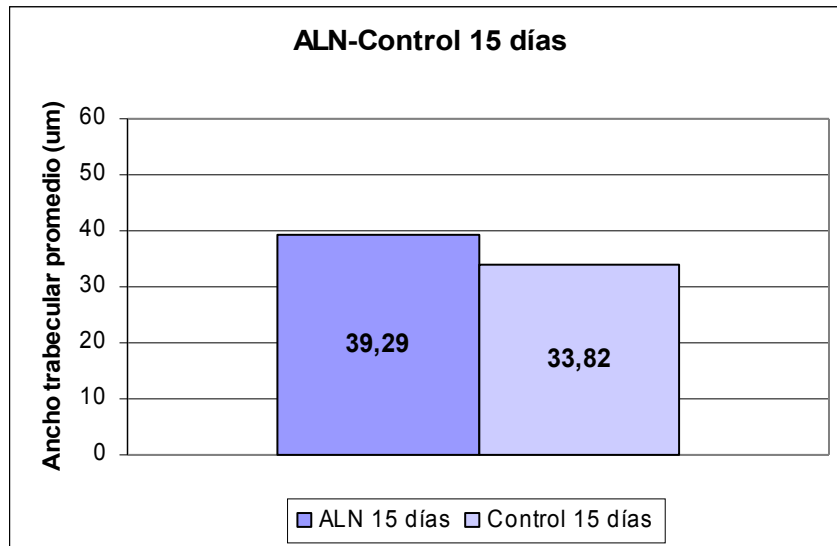


Fig. N° 63 Gráfico comparativo de los anchos trabeculares promedio de Grupo ALN problema y control a los 15 días.

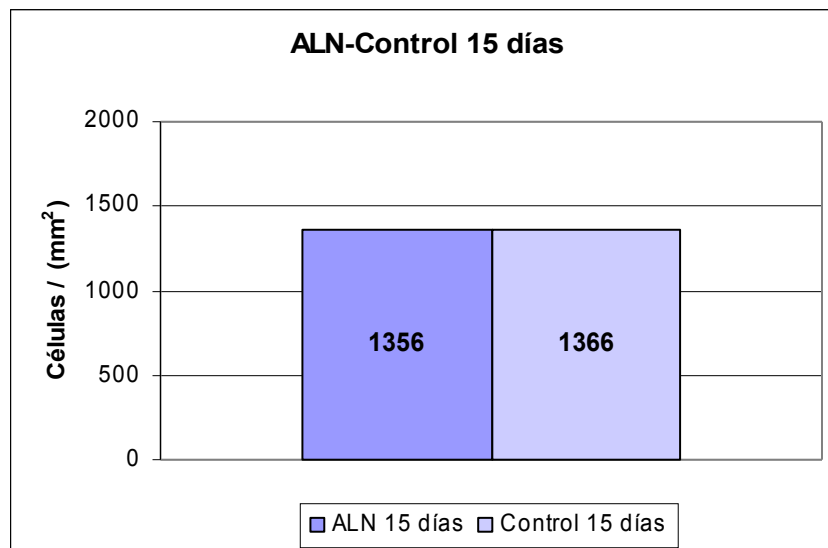


Fig. N° 64 Número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabecular en grupo ALN Problema y control. Tiempo experimental: 15 días



15 días	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias								
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias		Error típ. de la diferencia	
	Inferior	Superior						Inferior	Superior	Inferior	Superior
Ancho trabecular	1,248	0,265	-1,17	297,03	0,2422	-2,31	1,97	-6,19	1,57		
Células por mm <sup>2</sup>	9,336	0,007	-0,06	11,89	0,9565	-9,50	170,55	-381,49	362,49		

Tabla 6 Análisis estadístico prueba T. Student, donde no presenta diferencias estadísticamente significativas en el ancho trabecular y en el N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea, a los 15 días post-tratamiento, en el grupo ALN, entre los casos problemas y controles

## ALN 30 días

Se observa que en cuanto al promedio de los anchos trabeculares, el grupo problema presenta mayor tamaño de las trabéculas que los respectivos controles. Asimismo el número de células por mm<sup>2</sup> de superficie es mayor en el grupo problema que en el control. (Tablas 7 y 8, y Fig N° 65 y 66).

Estadísticamente, en los anchos trabeculares no existen diferencias significativas en este tiempo experimental entre ALN y su respectivo control. A nivel de N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea, si existe diferencias estadísticamente significativas (p= 0.0008) con la prueba de T Student ( tabla 9)

Problema ALN 30 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
ALN (1)	51,65	81,98	27,60	32	28.929,31	1.106
ALN (2)	45,47	74,01	6,58	25	17.317,80	1.444
ALN (3)	50,92	78,57	26,86	27	17.694,87	1.526
ALN (4)	66,48	83,87	56,77	34	27.712,74	1.227
ALN (5)	47,76	95,16	28,86	36	30.595,14	1.177
ALN (6)	40,46	79,26	10,28	48	26.964,48	1.780
ALN (7)	42,14	85,03	5,66	31	17.532,83	1.768
ALN (8)	34,49	53,40	7,63	23	13.504,14	1.703
ALN (9)	32,52	56,99	15,84	15	10.162,77	1.476
ALN (10)	99,83	117,34	81,26	48	50.091,07	958
<b>Promedios</b>	<b>51,17</b>	117,34	5,66			<b>1.416</b>

Tabla 7 Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. ALN 30 días casos problema

Control	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )	Cél/Área	Area	Cél/mm <sup>2</sup>
---------	-------------------------------------	----------	------	---------------------

CTR 30 días	Promedio	Máx	Mín		( $\mu\text{m}^2$ )	
CTR (1)	45,87	72,10	21,79	37	48.651,52	761
CTR (2)	45,41	67,73	31,88	14	10.030,68	1.396
CTR (3)	49,66	72,56	24,42	13	9.915,55	1.311
CTR (4)	39,11	64,87	15,10	9	14.588,96	617
CTR (5)	49,20	97,25	22,59	13	13.581,70	957
CTR (6)	33,61	54,04	15,31	12	12.622,57	951
CTR (7)	42,78	96,39	16,73	10	11.138,52	898
CTR (8)	40,45	76,55	13,08	19	21.930,79	866
CTR (9)	64,54	95,57	30,17	14	17.729,33	790
CTR (10)	62,41	109,37	25,65	20	24.527,36	815
<b>Promedios</b>	<b>47,31</b>	109,37	13,08			<b>936</b>

Tabla 8 Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por  $\text{mm}^2$  de superficie ósea neoformada. ALN 30 días casos controles

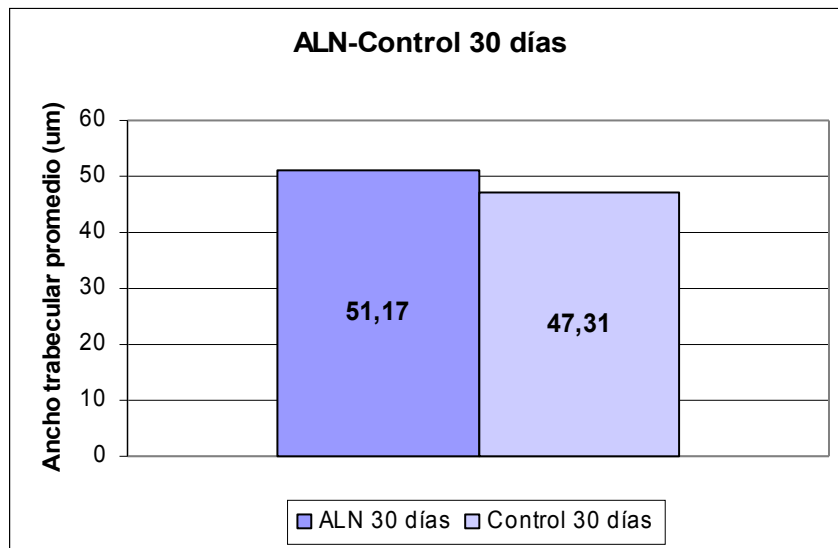


Fig N° 65 Ancho trabecular promedio de Grupo ALN problema y control a los 30 días.

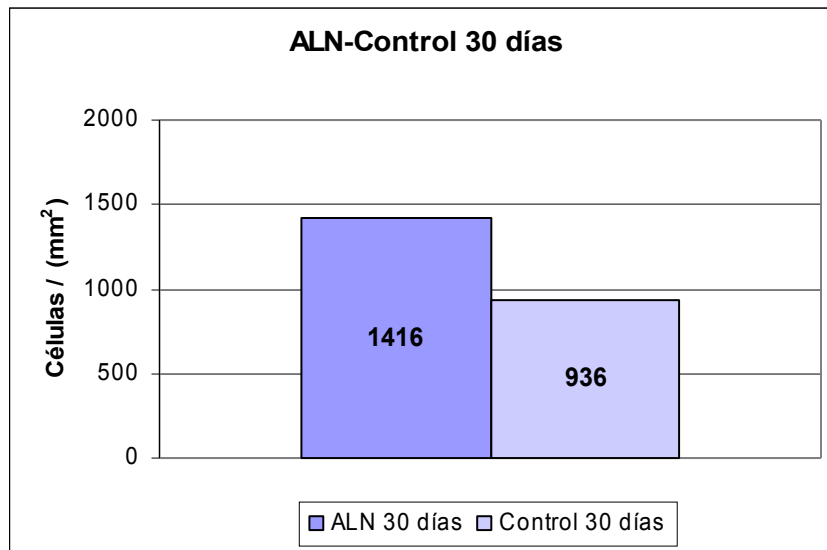


Fig. N° 66 Número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabecular en grupo ALN problema y control. Tiempo experimental: 30 días notándose mayor cantidad de células en el grupo problema que en el grupo control.

30 días	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias										
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias		Error típ. de la diferencia		95% Intervalo de confianza para la diferencia	
Inferior	Superior	Inferior						Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
Ancho trabecular	0,054	0,816	0,126	303	0,8994	0,32657288	2,582	-4,754	5,407				
Células por mm <sup>2</sup>	0,956	0,341	4,025	17,4553	<b>0,0008</b>	480,3	119,328	229,038	731,562				

Tabla 9 Prueba estadística de T Student, mostrando que a nivel de anchos trabeculares, no hay diferencia estadísticamente significativas, pero si hay en cuanto a N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea, con una p = 0,0008. en el tiempo experimental de 30 días, en el grupo ALN entre los casos problemas y los controles..



En los siguientes gráficos se observan comparativamente en los tres tiempos experimentales, el ancho trabecular (Fig 67 y tabla 10)

Ancho trabecular promedio en $\mu\text{m}$	Días	ALN	CTRL_Aln
	7 d	40,46	38,18
	15 d	39,29	33,82
	30 d	51,17	47,31

Tabla 10 Anchos trabeculares promedio de los tres tiempos experimentales ALN

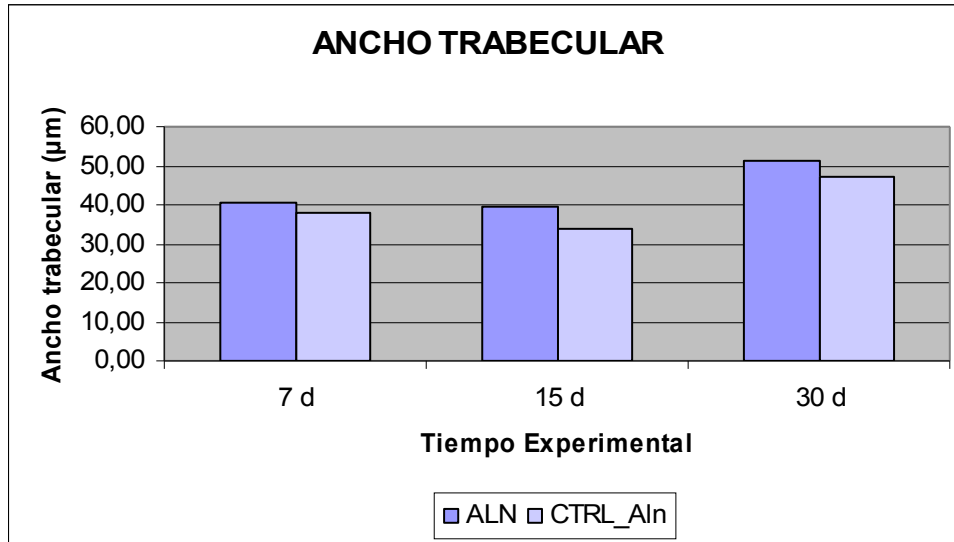


Fig. N° 67 Gráfico comparativo de ALN con sus respectivos controles, en los diferentes tiempos experimentales, referido al ancho trabecular promedio.

En todos los tiempos experimentales, el ancho trabecular promedio del hueso neoformado, es mayor en los casos problemas que en sus controles respectivos. No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre ellos.(Tabla 11)

Estadísticos de contraste Ancho trabecular	Aln - Ctrl(A)		
	7 días	15 días	30 días
U de Mann-Whitney	12102	10869	11487
W de Wilcoxon	28392	23589	22662
Z	-0,61	-1,06	-0,18
Sig. asintót. (bilateral)	0,5441	0,2904	0,8608
T Student Sig. (bilateral)	0,6058	0,2422	0,8994

Tabla 11 Análisis estadístico comparando todos los tiempos experimentales, en referencia al ancho trabecular promedio de hueso neoformado. Grupo ALN . Casos Problemas y controles.

Comparando en los distintos tiempos experimentales, el N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada en el grupo ALN, se encontró que es mayor en los casos problemas que en los controles respectivos. La mayor diferencia se encontró a los 30 días post-quirúrgicos.

Células por mm <sup>2</sup>	Días	ALN	CTRL_Aln
	7 d	1582	1482
15 d	1356	1366	
30 d	1416	936	

Tabla 12 N° de células por

mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada

Comparando los tres tiempos experimentales del grupo ALN.

Casos problemas y casos controles.

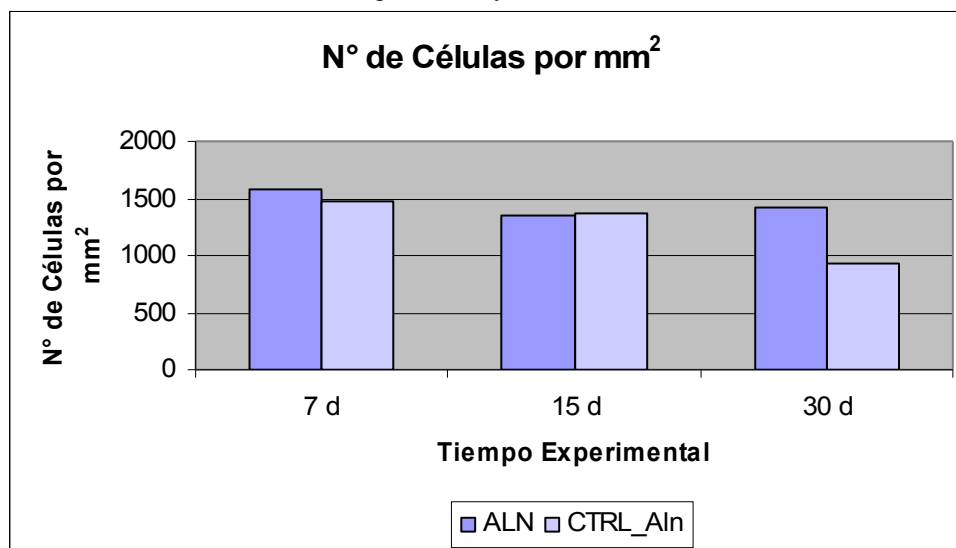


Fig. N° 68 Gráfico comparativo de ALN con su respectivo control en los diferentes tiempos experimentales referido al número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabécular

Realizando una comparación entre los diferentes tiempos experimentales entre ALN y sus respectivos controles, en el siguiente cuadro observamos tanto para la prueba T Student como en el test de Mann-Whitney, no se encontró diferencias estadísticamente significativas en relación a los anchos trabeculares, En relación al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea, a los 30 días hay diferencias significativas con una p= 0.0008 en el Test de Student y con Mann Whitney 0,0015. (Tabla 13)



Estadísticos de contraste <b>Células por mm<sup>2</sup></b>	Aln – Ctrl(A)		
	7 días	15 días	30 días
U de Mann-Whitney	48	44	8
W de Wilcoxon	103	99	63
Z	-0,1512	-0,4536	-3,1749
Sig. asintót. (bilateral)	0,8798	0,6501	<b>0,0015</b>
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,9118	0,6842	<b>0,0007</b>
<b>T Student Sig. (bilateral)</b>	0,4507	0,9565	<b>0,0008</b>

Tabla 13- Análisis estadístico comparando en ALN con sus respectivos controles en los diferentes tiempos experimentales, referido al número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabécular. Se encontró diferencias estadísticamente representativas e los 30 días p=0,0008 (T Student) y p=0,0015 con la prueba de Mann. Whitney.

## Hidróxido de Calcio

### 7 días.

Se observa que en cuanto al ancho trabecular promedio, el grupo problema presenta mayor tamaño de las trabéculas que los respectivos controles. No siendo así en cuanto al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ya que es mayor en el grupo control que en el grupo problema. ( Fig N° 83 y 84). No se evidenció diferencia estadísticamente representativa.

Problema Ca 7 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
Ca (1)	58,42	86,63	42,09	35	15.037,53	2.328
Ca (2)	67,94	125,87	19,04	34	22.322,41	1.523
Ca (3)	44,12	70,77	24,96	21	14.913,23	1.408
Ca (4)	36,17	51,31	17,08	28	15.790,12	1.773
Ca (5)	53,75	86,43	20,51	36	30.463,09	1.182
Ca (6)	38,24	91,82	13,55	57	27.707,89	2.057
Ca (7)	40,29	71,10	14,09	34	22.415,38	1.517
Ca (8)	37,60	77,30	9,17	34	23.585,72	1.442
Ca (9)	37,01	62,34	9,98	23	13.599,02	1.691
Ca (10)	61,97	138,75	20,56	53	36.257,29	1.462
<b>Promedios</b>	<b>47,55</b>	138,75	9,17			<b>1.638</b>

Tabla 14 Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. CA (OH)<sub>2</sub> 7 días casos problemas

Control CTR 7 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
CTR (1)	42,65	55,77	24,25	16	10.640,95	1.504
CTR (2)	37,37	66,86	16,79	12	6.245,93	1.921
CTR (3)	25,89	45,62	12,95	22	11.655,48	1.888
CTR (4)	27,63	41,68	14,96	13	8.587,83	1.514
CTR (5)	27,76	56,36	11,75	17	9.593,18	1.772
CTR (6)	26,55	61,87	12,16	11	5.761,87	1.909
CTR (7)	25,11	46,81	9,58	18	12.572,19	1.432
CTR (8)	22,15	39,65	7,89	17	14.043,61	1.211
CTR (9)	24,54	38,64	10,60	32	21.113,11	1.516
CTR (10)	25,05	35,64	13,64	23	11.780,48	1.952
<b>Promedios</b>	<b>28,47</b>	66,86	7,89			<b>1.662</b>

Tabla 15 Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. Ca(OH)<sub>2</sub> 7 días casos controles

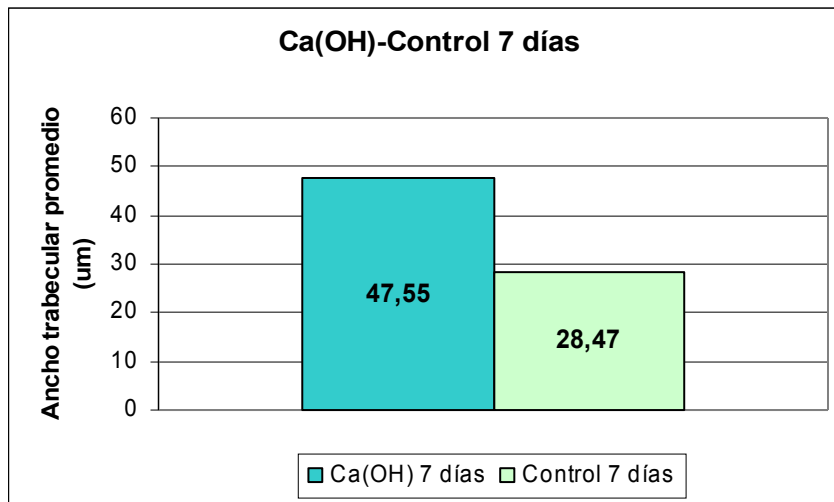


Fig N° 69 Ancho trabecular promedio de Grupo Ca (OH)<sub>2</sub> problema y control a los 7 días.

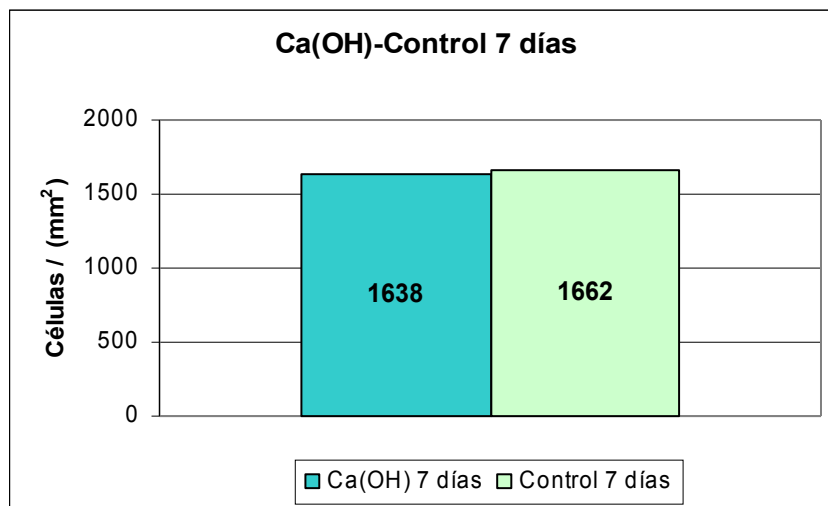


Fig. N° 70 Número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabecular en grupo Ca(OH)<sub>2</sub> problema y control. Tiempo experimental: 7 días

El análisis estadístico realizado con el test de Student mostró diferencias altamente significativas en este tiempo experimental entre el grupo problema y el grupo control, en relación al ancho trabecular ( $p= 0,0000$ ). No existiendo diferencia estadísticamente significativas en relación al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea. (tabla 16).

7 días	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias		95% Intervalo de confianza para la diferencia
Inferior	Superior	Inferior						Superior	Inferior	Superior
Ca(OH) - Ctrl(Ca)										
Ancho trabecular	8,487	0,009	7,02	307,743	0,0000	13,11	1,87	9,44	16,78	
Células por mm <sup>2</sup>	0,215	0,648	-0,18	18	0,8628	-23,60	134,60	-306,39	259,19	

Tabla 16- Análisis estadístico prueba T Student en el grupo Ca(OH)<sub>2</sub>, tiempo experimental 7 días. Referido al ancho trabecular y al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea. Mostró diferencias altamente significativas (p=0,000) entre los casos problemas y sus controles respecto al ancho de las trabéculas, no así al número de células.

### Hidróxido de Calcio 15 días.

Se observó que en cuanto al ancho trabecular, el grupo problema presenta mayor tamaño de las trabéculas que los respectivos controles. Asimismo el N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie fue mayor en el grupo problema que en el grupo control. ( tablas 17 y 18 -Fig N° 71y 72)

Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los anchos trabeculares en este tiempo experimental entre Ca(OH)<sub>2</sub> y su control con una p= 0,01, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en relación al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea (tabla 19).

Problema Ca 15 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
Ca (1)	38,43	99,57	17,91	22	16.359,36	1.148
Ca (2)	65,57	90,92	34,17	54	26.714,48	2.021
Ca (3)	127,71	143,93	114,34	29	31.634,78	917
Ca (4)	43,36	65,54	25,66	27	23.181,64	1.165
Ca (5)	61,99	104,02	20,11	41	39.197,69	1.046
Ca (6)	43,13	61,14	27,87	29	24.160,50	1.200
Ca (7)	39,64	84,60	21,95	31	27.632,93	1.122
Ca (8)	50,15	91,44	18,96	40	35.099,76	1.140
Ca (9)	38,66	75,80	17,44	24	20.317,59	1.181
Ca (10)	53,68	88,75	19,20	44	44.362,27	992
<b>Promedios</b>	<b>56,23</b>	143,93	17,44			<b>1.193</b>

Tabla 17- Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. Ca(OH)<sub>2</sub> 15 días casos problemas.

Control CTR 15 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
CTR (1)	44,71	70,80	19,17	20	18094,11	1.105
CTR (2)	85,98	149,44	52,90	50	32.795,25	1.525
CTR (3)	47,81	78,78	12,92	11	14.982,31	734
CTR (4)	53,65	86,04	30,06	21	14.875,83	1.412
CTR (5)	48,10	76,53	26,61	8	7.023,62	1.139
Ca (6)	29,28	56,82	12,01	39	17.467,90	2.233
Ca (7)	25,72	42,14	9,17	25	18.367,99	1.361
Ca (8)	34,75	63,80	8,97	33	22.026,68	1.498
Ca (9)	39,93	68,35	19,42	39	21.173,88	1.842
Ca (10)	25,90	54,62	11,70	21	9.400,84	2.234
<b>Promedios</b>	<b>43,58</b>	149,44	8,97			<b>1.508</b>

Tabla 18. Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. Ca(OH)<sub>2</sub> 15 días casos controles

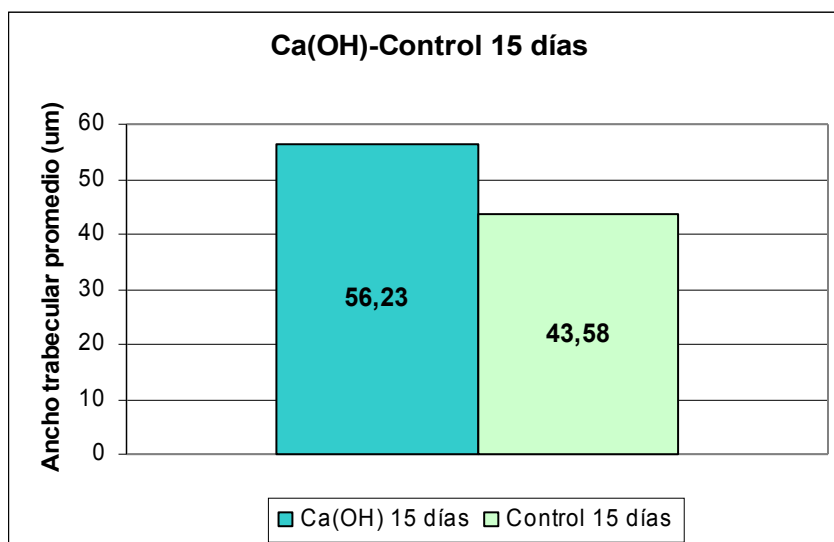


Fig N° 71- Ancho trabecular promedio de Grupo Ca (OH)<sub>2</sub> problemas y controles a los 15 días.

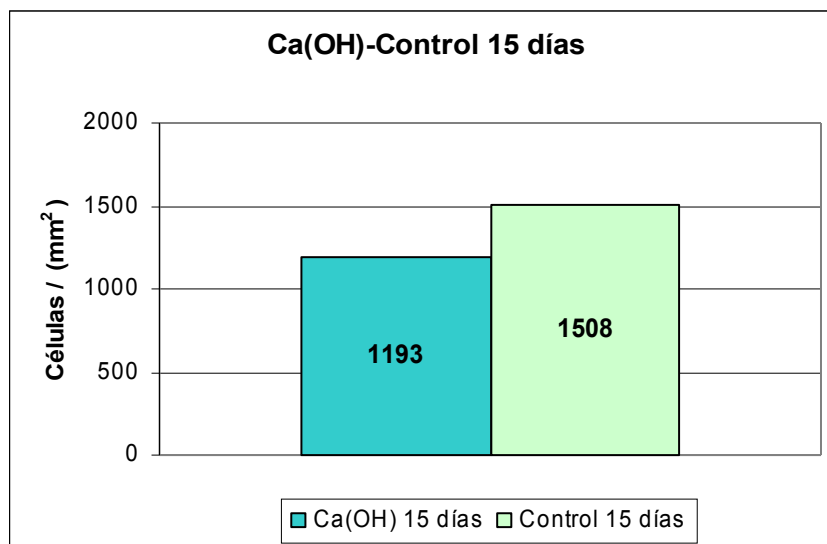


Fig. N° 72- Número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabecular en grupo Ca(OH)<sub>2</sub> Problemas y controles . Tiempo experimental: 15 días

15 días	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
	Inferior	Superior							
	Ca(OH) - Ctrl(Ca)								
Ancho trabecular	10,882	0,001	3,22	313,567	0,0014	8,61	2,68	3,34	13,87
Células por mm <sup>2</sup>	2,486	0,132	-1,75	15,1928	0,1008	-315,10	180,36	-699,11	68,91

Tabla 19- Análisis estadístico. Ca(OH)<sub>2</sub> 15 días casos problemas y controles. Se encontró diferencias estadísticamente representativas, en relación al ancho trabecular, (p=0,001) , no así en relación al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada.



## Hidróxido de Calcio 30 días.

Se observó que el ancho trabecular del grupo problema presenta mayor tamaño de las trabéculas que los respectivos controles. Por el contrario, en cuanto al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie, es mayor la densidad celular en el grupo control que en el grupo problema. (Tablas 20 y 21- Fig 73 y 74)

Problema Ca 30 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
Ca (1)	36,22	73,40	11,63	41	26.311,96	1.558
Ca (2)	38,86	57,85	15,69	25	21.851,15	1.144
Ca (3)	63,85	132,41	24,13	42	28.768,47	1.460
Ca (4)	79,00	120,19	38,75	59	38.930,04	1.516
Ca (5)	79,72	118,07	52,63	33	25.905,63	1.274
Ca (6)	49,97	71,59	18,82	31	19.872,82	1.560
Ca (7)	52,48	91,57	24,61	45	32.023,28	1.405
Ca (8)	60,64	110,83	9,34	39	22.922,99	1.701
Ca (9)	44,26	104,13	17,57	37	30.304,12	1.221
Ca (10)	44,87	127,70	6,50	44	33.493,65	1.314
<b>Promedios</b>	<b>54,99</b>	132,41	6,50			<b>1.415,28</b>

Tabla 21- Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. Ca(OH)<sub>2</sub> 30 días casos problemas

Control CTR 30 días	Trabécula (Ancho en $\mu\text{m}$ )			Cél/Área	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Cél/mm <sup>2</sup>
	Promedio	Máx	Mín			
CTR (1)	26,84	55,87	6,71	22	14.689,20	1.498
CTR (2)	47,16	62,18	29,76	19	15.535,28	1.223
CTR (3)	61,04	105,64	39,26	42	32.993,83	1.273
CTR (4)	66,80	78,22	51,61	43	29.626,84	1.451
CTR (5)	57,49	102,16	29,24	14	14.056,07	996
Ca (6)	43,52	65,37	11,00	20	15.997,87	1.250
Ca (7)	27,34	77,69	8,65	30	16.906,28	1.774
Ca (8)	34,62	95,57	8,42	43	27.819,56	1.546
Ca (9)	30,66	55,91	18,31	13	6.811,37	1.909

Ca (10)	31,02	71,26	10,63	36	23.557,15	1.528
<b>Promedios</b>	<b>42,65</b>	105,64	6,71			<b>1.445</b>

Tabla 22- Mediciones de anchos trabeculares y N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada. Ca(OH)<sub>2</sub> 30 días casos controles

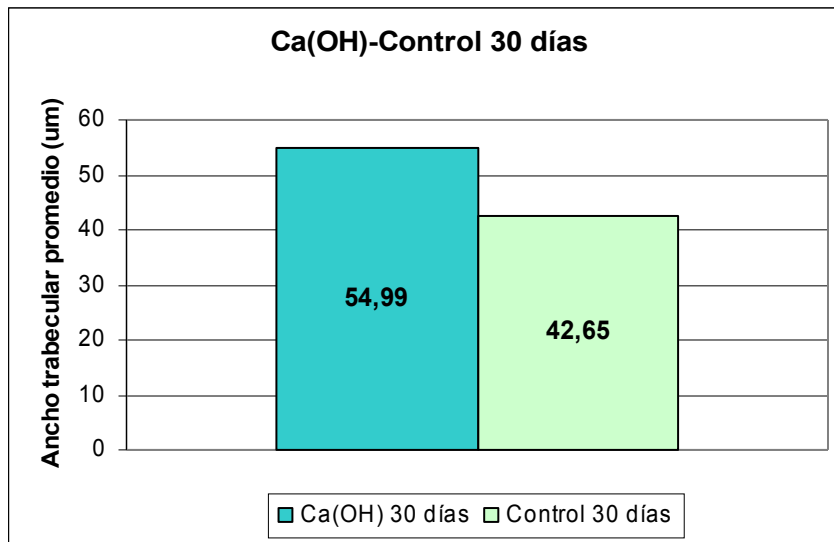


Fig. N° 73- Ancho trabecular promedio de Grupo Ca (OH)<sub>2</sub> problemas y Controles, tiempo experimental, 30 días.

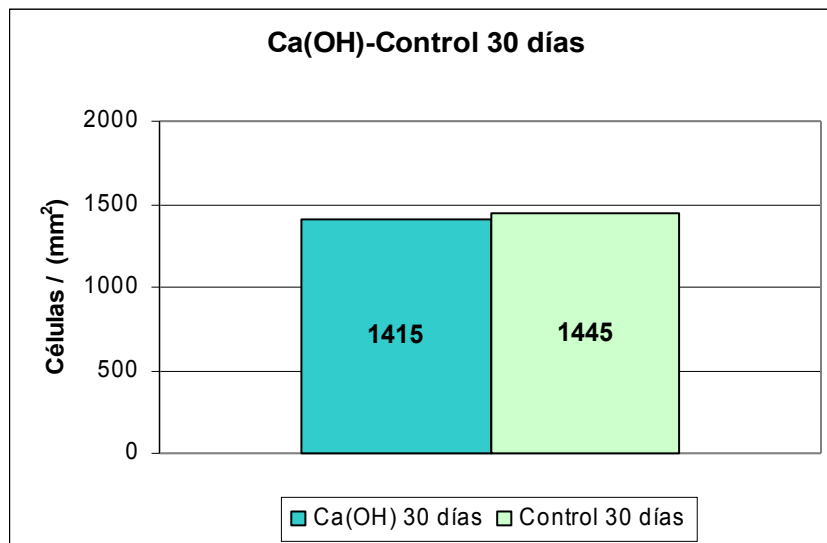


Fig. N° 74- Número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabecular en grupo Ca(OH)<sub>2</sub> Problemas y controles. Tiempo experimental: 30 días

El análisis estadístico en éste tiempo experimental, mostró que existe diferencias

30 días	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias										
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias		Error típ. de la diferencia		95% Intervalo de confianza para la diferencia	
	Inferior	Superior						Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Ca(OH) - Ctrl(Ca)													
Ancho trabecular	9,122	0,003	3,69	344,656	<b>0,0003</b>	10,24	2,77	4,78	15,70				
Células por mm <sup>2</sup>	1,211	0,286	-0,29	18	0,7760	-29,50	102,13	-244,06	185,06				

estadísticamente significativas, en relación al ancho trabecular (p= 0,0003). No siendo así en relación al N° de células, donde no se encontró diferencias estadísticamente representativas (Tabla 23)

Tabla 23- Análisis estadístico. Ca(OH)<sub>2</sub> 30 días casos problemas y controles. Se encontró diferencias estadísticamente representativas con la prueba T Student (p=0,0003), en relación al ancho trabecular, no así en relación al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada.

En los siguientes gráficos se comparó los tres tiempos experimentales, el ancho trabecular del grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , y se encontró que el ancho de las trabéculas neoformadas son mayores en los casos problemas que en los controles respectivos. (Tabla 24 y Fig N° 75)

Ancho trabecular promedio en $\mu\text{m}$	Días	Ca(OH)	CTRL_Ca
	7 d	47,55	28,47
	15 d	56,23	43,58
	30 d	54,99	42,65

Tabla 24- comparación de las anchos trabeculares en los tres tiempos experimentales de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

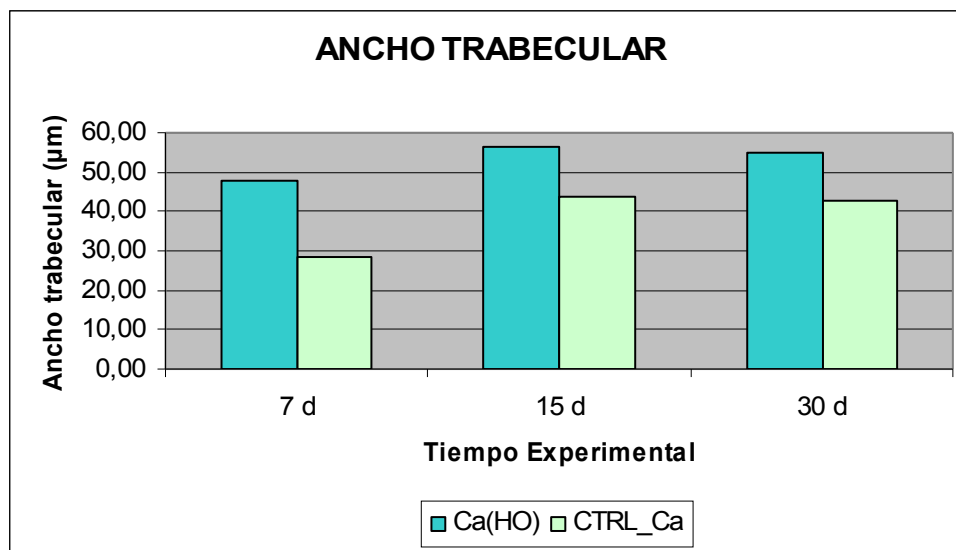


Fig.Nª 75 -Gráfico comparativo de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con su respectivo control en los diferentes tiempos experimentales referido al ancho trabecular promedio, muestra que en todos los casos, en el grupo problema siempre el ancho de las trabéculas es mayor que en los casos controles.

Se comparó los tres tiempos experimentales entre sí, en relación al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoformada, se encontró que en todos los casos, es mayor en los casos controles que en los casos problemas.( Tabla 25 y Fig. N° 76)

Células por mm <sup>2</sup>	Días	Ca(HO)	CTRL Ca
	7 d	1638	1662
	15 d	1193	1508
	30 d	1415	1445

Tabla 75- Comparación del N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea, en todos los tiempos experimentales. Ca(OH)<sub>2</sub> casos problemas y controles

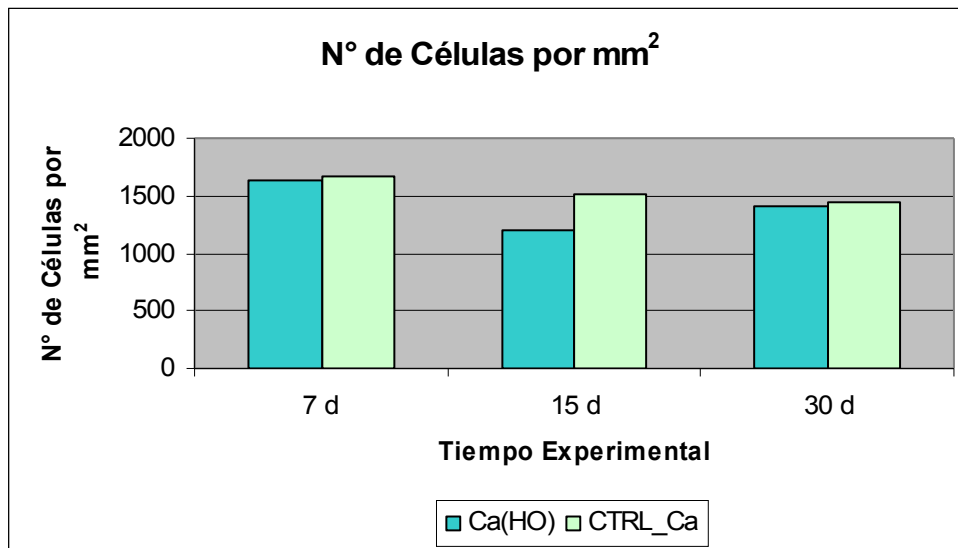


Fig. N°76- Gráfico comparativo de Ca(OH)<sub>2</sub> con su respectivo control en los diferentes tiempos experimentales referido al número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabecular

El análisis estadístico de los tres tiempos experimentales de Ca(OH)<sub>2</sub> entre los casos problemas y controles, mostró que hay diferencias estadísticamente significativas en relación al ancho trabecular, No así en relación al N° de células , donde no se encontró diferencias significativas. (tablas 26 y 27)

Estadísticos de contraste trabecular	Ancho	CaOH - Ctrl(Ca)		
		7 días	15 días	30 días
U de Mann-Whitney		9385	11957	12273
W de Wilcoxon		24091	26153	26301
Z		-6,45	-2,59	-3,33
Sig. asintót. (bilateral)		<b>0,0000</b>	<b>0,0097</b>	<b>0,0009</b>
T Student	Sig. (bilateral)	<b>0,0000</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0003</b>

Tabla 26-Análisis estadístico  $\text{Ca(OH)}_2$  entre los grupos problemas y controlas en los tres tiempos experimentales.  
Se encontró diferencias estadísticamente significativas con las de prueba Mann-Whitney y T Student

Estadísticos de contraste por $\text{mm}^2$	Células	CaOH - Ctrl(Ca)		
		7 días	15 días	30 días
U de Mann-Whitney		46	28	49
W de Wilcoxon		101	83	104
Z		-0,3024	-1,6630	-0,0756
Sig. asintót. (bilateral)		0,7624	0,0963	0,9397
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]		0,7959	0,1051	0,9705
T Student	Sig. (bilateral)	0,8628	0,1008	0,7760

Tabla 27-Análisis estadístico  $\text{Ca(OH)}_2$  entre los grupos problemas y controlas en los tres tiempos experimentales. relacionando el N° de células por  $\text{mm}^2$  de superficie ósea.  
No se encontró diferencias estadísticamente significativas con las de prueba Mann-Whitney y T Student

En el siguiente gráfico observamos comparativamente los dos grupos de estudios con sus respectivos controles, en los tres tiempos experimentales, viendo que el ancho trabecular en el grupo  $\text{Ca}(\text{HO})_2$  es mayor que el de grupo ALN. (Fig N°77)

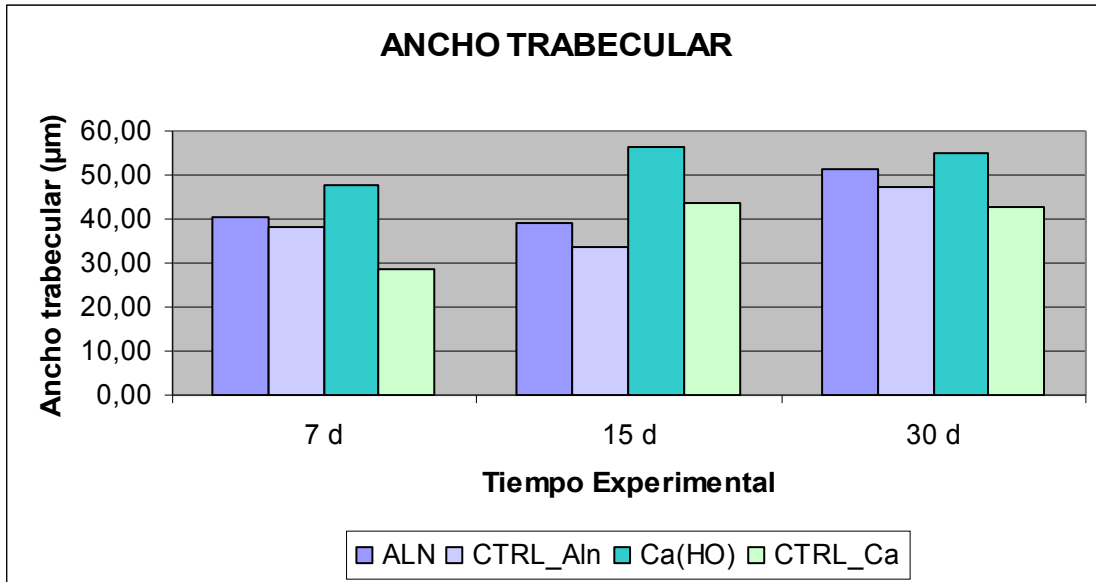


Fig. N° 77- Gráfico comparativo de ALN con su respectivo control e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con su respectivo control en los diferentes tiempos experimentales referido al ancho trabecular promedio.

En la siguiente figura se grafican los dos grupos de estudios con sus respectivos controles, en los tres tiempos experimentales, analizando el N° de células por  $\text{mm}^2$  de superficie ósea. Se observó que el número de células por  $\text{mm}^2$  de superficie en el grupo ALN es mayor que el de grupo  $\text{Ca}(\text{HO})_2$ , en los casos problemas, y en los casos controles, se presentó de manera inversa, siendo mayor el N° de células en  $\text{Ca}(\text{HO})_2$  que en ALN. (Fig N°78)

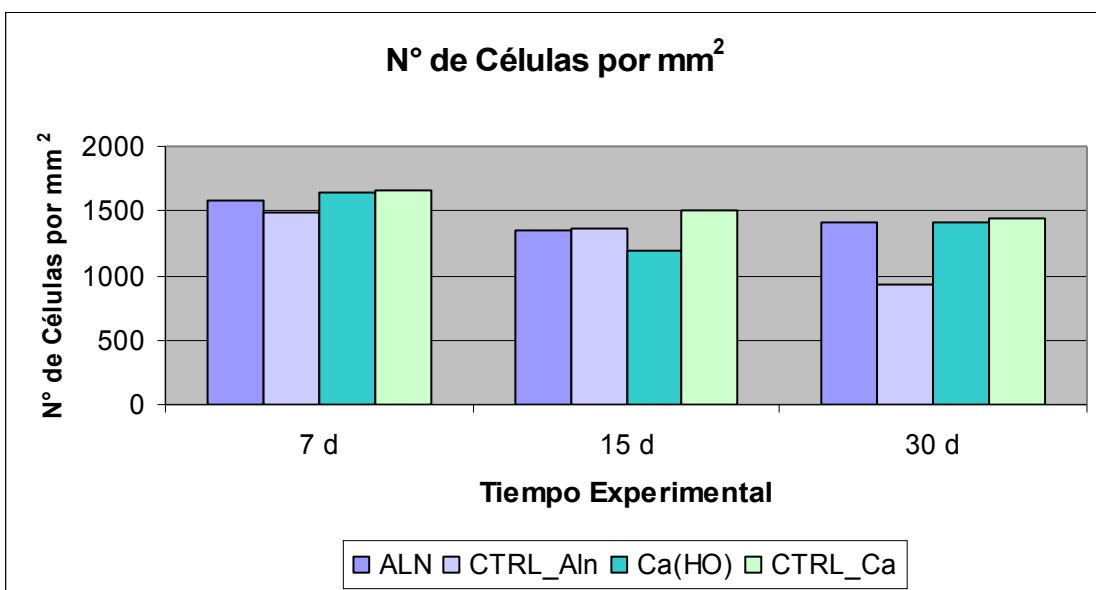


Fig. N° 78 Gráfico comparativo de ALN con su respectivo control e Ca(OH) con su respectivo control en los diferentes tiempos experimentales referido al número de células por mm<sup>2</sup> de superficie trabecular.

Se realizó el análisis estadístico con las pruebas de T Sudent y Mann Whitney, se comparó el grupo ALN y el grupo Ca (HO)<sub>2</sub>, en relación al ancho trabecular y al N° de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea y se encontró que existen diferencias significativas en los anchos de las trabéculas en los tres tiempos experimentales, y no se encontró diferencias en relación al

7 días	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia
	Inferior	Superior								Inferior
ALN - Ca(OH)										
Ancho trabecular	0,487	0,486	-1,99	360	<b>0,0474</b>	-4,31	2,17	-8,58	-0,05	
Células por mm <sup>2</sup>	0,029	0,868	-0,38	18	0,7098	-56,00	148,13	-367,21	255,21	

N° de células . (Tablas 28-29-30-31y 32)

Tabla 28 Prueba T Sudent  
Tabla 29- Prueba T Student

30 días	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
			F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
	Inferior	Superior							
ALN - Ca(OH)									
Ancho trabecular	9,999	0,002	-2,03	337,594	<b>0,0434</b>	-5,69	2,81	-11,21	-0,17
Células por mm <sup>2</sup>	3,309	0,086	0,01	14,8227	0,9912	1,20	107,02	-227,14	229,54

Tabla 30- Prueba T Student

Estadísticos de contraste Ancho trabecular	ALN - CaOH		
	7 días	15 días	30 días
U de Mann-Whitney	14159	8674	13040
W de Wilcoxon	30449	21394	25286
Z	-2,23	-5,62	-1,53
Sig. asintót. (bilateral)	<b>0,026</b>	<b>0,0000</b>	0,1252

T Student	Sig. (bilateral)	<b>0,0474</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0434</b>
-----------	------------------	---------------	---------------	---------------



Tabla 31- Análisis estadístico Man- Whitney y prueba de T Student

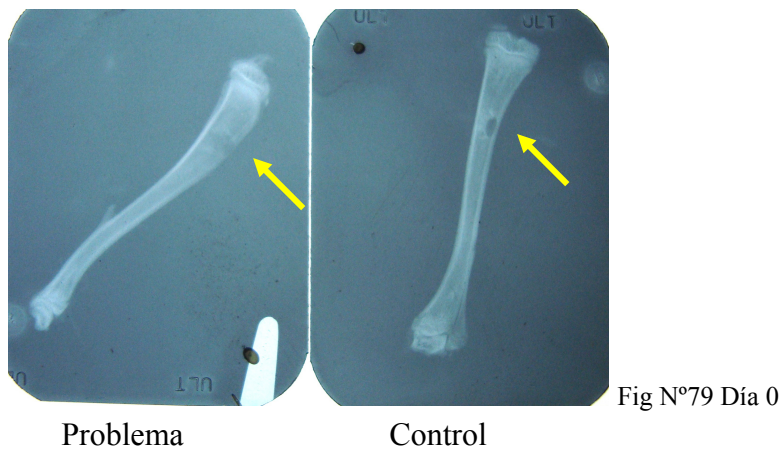
Estadísticos de contraste <b>Células por mm<sup>2</sup></b>	ALN - CaOH		
	7 días	15 días	30 días
U de Mann-Whitney	41	40	49
W de Wilcoxon	96	95	104
Z	-0,6803	-0,7565	-0,0756
Sig. asintót. (bilateral)	0,4963	0,4494	0,9397
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,5288	0,4813	0,9705
T Student Sig. (bilateral)	0,7098	0,3927	0,8628

Tabla 32- Análisis estadístico Man- Whitney y prueba de T Student

## **RESULTADOS RADIOGRÁFICOS**

En esta radiografía se observa las cavidades talladas al día 0, y en la pata problema colocado el ALN que es manifiesta su radiolucidez.

Nótese que la pata problema es aquella que presenta en la película una marca radiopaca, correspondiente a un instrumental que se colocó placa previo a la toma radiográfica. Se indica con una flecha la zona donde se realizó la cavidad experimental.

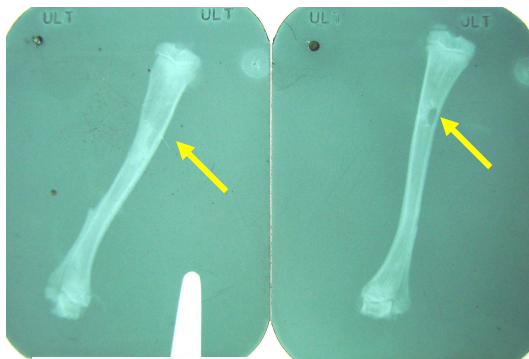


En los dos grupos (Alendronato e Hidróxido de Calcio), y en los progresivos tiempos experimentales se notó mayor radiopacidad en los problemas que en los controles respectivos. A los 30 días en los dos grupos problemas se observan totalmente cerrada las cavidades talladas.

## ALENDRONATO

En las estas radiografías, correspondiente al grupo de estudio ALN en los tres tiempos experimentales. Se puede apreciar en las patas problemas ( las radiografías marcadas conelemento radiopaco), a los 7 y 15 días, mayor radiopacidad en la zona tratada, no se observó zona radiolúcida correspondiente al tallado realizado, por el contrario en las patas controles. se observó nítidamente la cavidad experimental radiolúcida, con radiopacidad periférica.

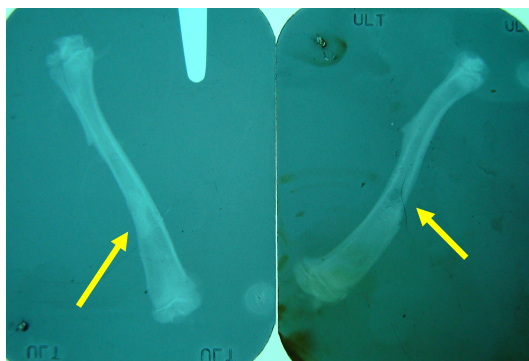
Al día 30 se observa en la zona de la cavidad tratada con ALN, mayor radiopacidad, que en las patas controles ( que no recibieron la droga), donde se evidencia una pequeña radiolucidez en la porción externa de la cavidad.



**Problema**

**Control**

Fig. N° 80 Día 7



**Problema**

**Control**

Fig. N° 81 Día 15



**Problema**

**Control**

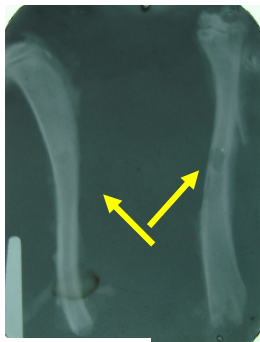
Fig. N° 82 Día 30



## HIDRÓXIDO DE CALCIO

A los 7 días es similar la imagen radiográfica en el grupo problema que en el control, siendo notoria la diferencia entre los grupos a los 15 y 30 días., donde se observó, mayor radiopacidad en el grupo tratado con  $\text{CA}(\text{OH})_2$  que en su control.

Es notoria la diferencia entre los grupos a los 15 y 30 días., donde se observó, mayor radiopacidad en el grupo tratado con  $\text{CA}(\text{OH})_2$  que en su control.( Fig. 83-84 y 85)



**Problema** **Control**

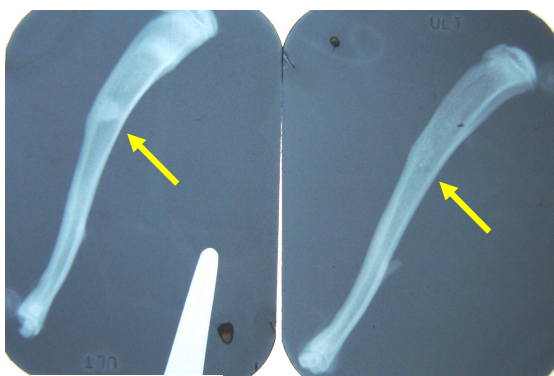
Fig. N° 83 7 días



**Problema**

**Control**

Fig. N° 84 Día 15



**Problema**

**Control**

Fig. N° 85 día 30

Con el Programa “Image Pro Plus 4.1 - Surface Plot” se confirmó lo observado en las radiografías, mayor densidad óptica en los casos problemas que en los casos control, en los dos grupos de estudio

Con ésta técnica, se pone en evidencia la densidad óptica que tiene su correspondencia con la densidad mineral.

- Imagen bidimensional con pseudocolor: las zonas de mayor densidad se representan con colores vivos (rojo- naranja ) y las zonas de menor densidad óptica con colores fríos (azul- verde). A la izquierda de las imágenes se observa la escala de colores correspondiente a las diferentes densidades ópticas.

- Imagen tridimensional surface Plot, en la cual se añade un eje Z proporcional a la densidad óptica (se aprecia un efecto tridimensional de relieve)

Las siguientes imágenes corresponden a patas de animales tratados con ALN, en el tiempo experimental de 15 días. (Fig. 86 y 87) Donde se observa (marcada con una flecha) la zona donde se realizó la cavidad experimental. Se confirma lo observado en las radiografías, mayor densidad en el grupo problema que en el control. Esto se evidencia por la gama de colores

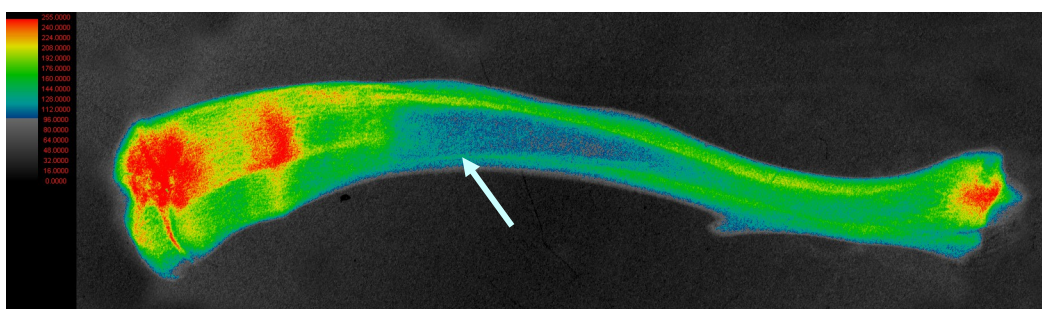


Fig. N° 86- Imagen bidimensional con el programa surface Plot ALN 15 días Control



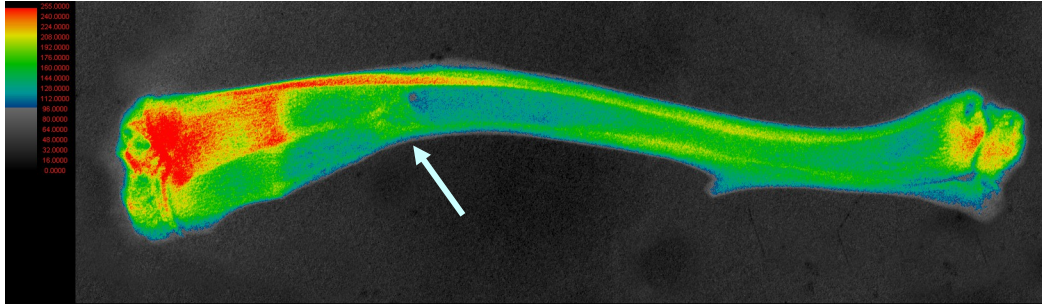


Fig. N° 87 Imagen bidimensional con el programa surface Plot ALN 15 días Problema

Las siguientes imágenes son las mismas descritas anteriormente, a las que se les aplica el programa surface Plot, observando la diferencia no sólo de colores de las distintas densidades ópticas, sino que se evidencia niveles de relieve según la mayor o menor densidad.

Aplicando este programa, se confirmó lo observado anteriormente en las imágenes bidimensional y en las radiografías, notándose mayor densidad óptica en los casos problemas que en los controles. En las zonas donde se realizó la experiencia, se observa diferencias de relieve entre los casos problemas y los controles, mostrándose más elevado en los primeros. (Fig. N1 88 y 89)

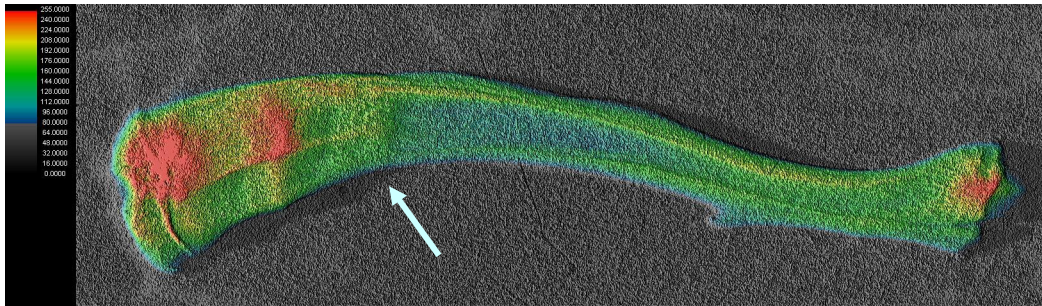


Fig. N° 88 Imagen tridimensional con el programa surface Plot ALN 15 días Problema.  
Se confirmó lo observado en las radiografías, mayor densidad, notándose mayor relieve en la zona tratada

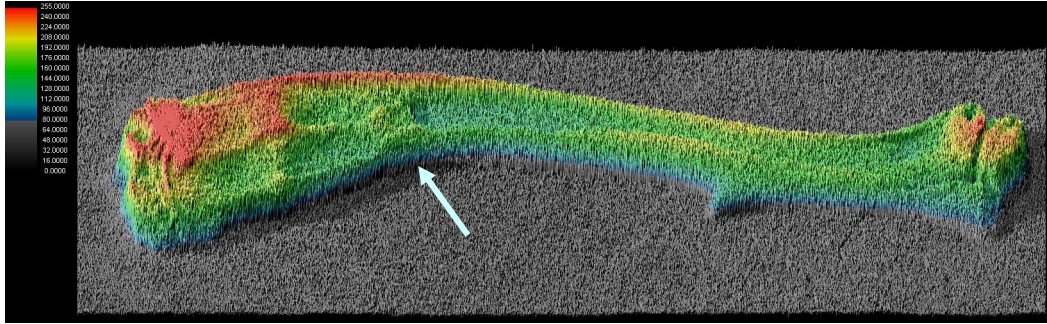


Fig. N° 89 Imagen tridimensional con el programa surface Plot ALN 15 días Control. Se observa diferente relieve ( menor) que el la imagen anterior, lo que indica menor densidad óptica, que se correspondería con menor densidad mineral.

## DISCUSIÓN



Son innumerables la cantidad de estudios que se realizan actualmente con el propósito de buscar solución a la pérdida de tejido óseo cualquiera sea la causa que lo provoque.

En el campo de la odontología se ha incrementado las investigaciones buscando solución a la pérdida ósea, para lograr recuperación de tejido tras tratamientos quirúrgicos, mejorar la calidad ósea (para la instalación de implantes dentales, en tratamientos ortodóncicos., en tratamientos periodontales, etc).

Con este objetivo se han propuesto materiales de relleno (injertos óseos: naturales y sintéticos), medicamentos o sustancias que promuevan la osteogénesis o bien la mejorar la densidad y calidad del hueso. Todos ellos pueden actuar como materiales osteoinductivos u osteoconductivos <sup>2-8-9-16-21-29-37-38-69-74</sup>.

Los Bifosfonatos son drogas que se desarrollan como análogos de los pirofosfatos del hueso, que provocan la inhibición de la resorción ósea mediada por osteoclastos y aumentan la densidad ósea. A nivel celular, actúan de manera preferencial en los sitios de reabsorción, a nivel del citoesqueleto de los osteoclastos. Está indicado en el tratamiento y la prevención de la osteoporosis en las mujeres post-menopáusicas, para el tratamiento de la enfermedad de Paget, el mieloma múltiple, la hipercalcemia maligna y las metástasis óseas asociadas al cáncer de mama o de próstata.

Si bien producen como ya fue expuesto una inhibición de la resorción ósea, mediante una disminución de la actividad de los osteoclastos, no intervienen en la formación y mineralización del hueso. Son fármacos utilizados a nivel mundial con claros beneficios contrastados clínicamente., También está indicado en el tratamiento de la osteoporosis inducida por corticoides y se está investigando su utilidad en la hipercalcemia asociada como la osificación maligna y heterotópica. <sup>14-15-23-24-25-35-39-47-54-55-58-59-61-62-73-</sup>

Los (BF) según su potencia relativa (de menor a mayor) se pueden agrupar en : Etidronato, Clodronato, Olpadronato, Ibandronato, ALENDRONATO, Risendronato y Zolendronato. Alguno de ellos son administrados por vía parenteral y otros por vía oral <sup>50-55-56-60.</sup>

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que los animales tratados con ALN, no sólo mejoran en general, la calidad ósea en referencia al tamaño de sus trabéculas y al número de células, sino que además la reparación de la lesión experimental (cavidad

realizada en las patas de las ratas) se produce antes en los casos problemas que en los controles en los tiempos estudiados..

Altudal <sup>2</sup>, en sus estudios de ALN en autoinjerto en ratas observa una mejoría en la densidad y calidad ósea, lo cual posiblemente se deba a que se encontró un incremento significativo de la osteocalcina en suero y de la fosfatasa alcalina. Así mismo, observó un incremento del número de osteoblastos, lo que concuerda con nuestras mediciones que evidencian un incremento en la densidad celular por mm<sup>2</sup> de tejido óseo reparativo.

A los 15 días de intervenidos los animales, se encontró en la zona de reparación además de las típicas trabéculas de hueso reaccional normal, núcleos de tejido cartilaginoso, probablemente por acción del ALN.

A los 30 días se evidencia histológicamente la reparación de las estructuras óseas donde se visualizó inmediatamente por fuera de la cortical de la zona reaccional, las imágenes típicas de la osificación endocondral: cartílago normal, seriado, hipertrofiado, calcificado y erosionado. También observamos zonas de depósito osteoide (acidófilo) alrededor de los restos de cartílago calcificado basófilo.

A medida que el proceso de osificación endocondral va progresando el hueso trabecular se organiza en Sistemas de Havers típicos del tejido óseo compacto maduro. Entre ellos quedan incluidos restos de cartílago. Además el periostio está organizado cubriendo la superficie tallada.

Tabuchi <sup>70</sup> al trabajar con animales tratados con ALN y proteína morfogenética ósea, encontró formación ósea normal, con cartílago persistente con islotes de hueso. El cartílago fue reemplazado por hueso trabecular y médula ósea adiposa. La actividad osteoinductiva de la proteína morfogenéticas como la velocidad para producir la osificación endocondral que ella induce, aumentan con el uso del ALN

Esto se ve corroborado por las investigaciones de Hayami y colaboradores<sup>30</sup>, que estudiaron la acción del ALN sobre el tejido cartilaginoso, y concluyeron que los bifosfonatos, pueden ser condroprotectores, por lo que serían drogas de excelencia en osteoartritis, ya que suprime la resorción ósea subcondral.

Lehamann <sup>39</sup> en sus estudios, también confirma que la degradación del cartílago de ve disminuida con el uso de ALN, esto coincide con nuestros hallazgos a los 15 y 30 días al observarse características similares a la osificación endocondral.

Por otro lado, Camacho<sup>10</sup> utilizando el ALN como terapia en niños con osteogénesis

imperfecta, observó aumento de la calidad ósea e incremento del microandamiaje óseo, lo que reduce la incidencia de fracturas en los niños.

También Madenci <sup>45</sup>, comprueba que el uso de ALN en la osteogénesis imperfecta en niños, mejora la calidad ósea en referencia a la estructura y densidad del mismo.

En nuestro trabajo experimental los resultados respecto a la calidad y espesor de la trabéculas coincide con lo descrito por ambos autores

Luchetti <sup>42</sup>, en un estudio en fémur de ratas utilizando pamidronato disódico, comprobó que en todos los casos indujo una mayor regeneración en los defectos óseos en comparación con los animales que no recibieron la droga,.

Reeve y colaboradores <sup>59</sup> investigaron en perros a los cuales les colocaron implantes dentarios y les administraron ALN. Concluyeron que el ALN, incrementa la masa ósea alrededor de la superficie del implante de titanio, pero que el factor que más influye en la oseointegración, es el tipo de superficie implantaria.

Chacón<sup>11</sup> estudió la integración de los implantes dentales endoóseos, y comprobó que en los casos tratados con ALN, se aumentaba el torque a la remoción del implante.

Con respecto a la regeneración ósea Sen y Gunes <sup>64</sup>, realizaron distracción osteogénica y administraron ALN, encontrando que se producía un efecto favorable en la neoformación en aquellos tratados con ALN

En la actualidad se ha encontrado manifestaciones de osteonecrosis de los maxilares relacionado con el uso de Bifosfonato ( BF). El posible papel de los BF en el inicio del desarrollo de la necrosis ósea avascular parece estar causada por su efecto antiangiogénico. <sup>15-49-52-72</sup> En éste trabajo no se evidencia falta de desarrollo vascular, por el contrario en los casos problemas, se identifica una mayor cantidad de vasos sanguíneos dilatados., por lo que no podemos corroborar lo sugerido por estos autores. Sería importante establecer las condiciones de uso, las dosis administradas y el tipo de bifosfonato utilizado para evitar este efecto negativo.

En general la curación de las heridas óseas ocurre mucho antes de poder ser visualizadas radiográficamente, ya que el hueso inmaduro no presenta la radiopacidad del hueso maduro. Para Baskar <sup>3</sup> y Bornancini <sup>6</sup> la neoformación ósea (hueso maduro) puede observarse radiográficamente después de un año y en algunos individuos después de dos años de realizada la intervención quirúrgica. Chiapasco <sup>11</sup> después de la enucleación de quistes de los maxilares, encontró a los 6 meses radiográficamente una reducción del 12%, a los 12 meses

del 43 % y 81% de los mismos 24 meses posterior a la intervención. En nuestro estudio se notó mayor radiopacidad en los casos problemas que en los controles acorde con los progresivos tiempos experimentales A los 30 días en el grupo problema se observaron totalmente radiopacas la cavidades talladas.

Otra sustancia ampliamente utilizada en odontología desde su introducción por Hermann en 1920 como inductora de síntesis de matriz conectiva y posterior mineralización, es el hidróxido de calcio  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  Se utiliza para un gran número de procedimientos, tales como: medicación intraconducto radicular, solución irrigadora de procedimientos endodónticos, como cemento sellador, reparación de perforaciones pulpares, recubrimientos pulpares y estimulador de la apexogénesis.

En un estudio sobre reparación ósea en procesos periapicales con fosfato tricálcico balanceado (FTB) Galvez <sup>26</sup> en 1998 como los de Costa <sup>13</sup> en 1999 y Ferrero Pastor <sup>22</sup> y col en el 2005, concluyen en que el FTB y el hidróxido de calcio respectivamente son biomateriales inductivos del proceso reparativo, actúa acelerando los mecanismos de proliferación celular, síntesis de colágena y de mineralización de la matriz proteica. Pudiendo ser potencialmente empleados en la solución de grandes defectos óseos, y entre otros como recubridor directo de los compromisos pulpares.

Zerbo IR, y col.<sup>78</sup> han demostrado que el fosfato tricálcico, es capaz de generar un andamiaje (osteoconducción) sobre el cual encontraron la formación de nuevo hueso y osteoide, en estrecho contacto con las partículas de fosfato tricálcico.

Crosa, Scarponi et al.<sup>14</sup>, han descrito que el Hidróxido de Calcio  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  es capaz de inducir la formación de una barrera cálcica en la pulpa dentario de ratas, y promover la formación de una matriz osteoide cuando el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  fue colocado en implantes en el tejido celular subcutáneo lo que nos hace pensar en el como un material osteoinductivo.

Veintes y col. <sup>71</sup> en estudios en humanos con lesiones periapicales mayores a 5 mm, utilizaron el Hidróxido de Calcio como material de relleno de los conductos radiculares y sobreobtención de los mismos, donde encontraron radiográficamente, que las lesiones periapicales disminuían a los tres meses de tratamiento.

Souza<sup>68</sup> destaca que el Hidróxido de Calcio estimula la precipitación de sales de calcio, favoreciendo la diferenciación celular y posterior aposición de tejido calcificado a nivel apical, activándose la fosfatasa alcalina, enzima presente en área de calcificación.

En este trabajo, se observan que en los tres tiempos experimentales el ancho trabecular y el número de células por mm<sup>2</sup> de superficie en los animales tratados con Hidróxido de Calcio es mayor que en los controles respectivos. A los 15 días del tiempo experimental observamos imágenes típicas de osificación endocondral en la zona de reparación que culminan con cartilago erosionado, a continuación se visualizan trabéculas óseas sintetizadas sobre restos de tejido cartilaginoso calcificado. En zonas más superficiales el tejido óseo neoformado tiende a adoptar una organización estructural de hueso compacto, presentando en algunas zonas sistemas de Havers pequeños y en otras las células de las trabéculas tienden a orientarse concéntricamente. El tejido medular evidencia una gran vascularización. Comportándose como material osteoinductivo. a los 30 días se evidencia la organización del tejido óseo compacto, que se verifica radiográficamente con una mayor radiopacidad que sus respectivos controles, por lo que se deduce que el Hidróxido de Calcio aceleraría el precipitado mineral.

## **CONCLUSIÓN**

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que ambos materiales Alendronato y Hidróxido de Calcio, en cavidades óseas experimentales en las ratas:

- Aceleran y promueven localmente la regeneración ósea, en las cavidades previamente talladas experimentalmente.
- Se comportan como materiales osteoinductivos, y no interfieren en el proceso normal de osificación endocondral. Mejoran la calidad del tejido óseo neoforado con un aumento del ancho de las trabeculas y la densidad celular por milímetro<sup>2</sup> en el tejido neoforado.
- En los tres tiempos experimentales (7-15 y 30 días) el ancho trabecular del tejido óseo neoforado, en el grupo el ALN es similar a los controles respectivos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.
- En los tres tiempos experimentales (7-15 y 30 días) el número de células por mm<sup>2</sup> de superficie ósea neoforada, en el grupo ALN es mayor que en los controles respectivos, pero sólo existe diferencias estadísticamente significativas en el tiempo experimental de 30 días, con una  $p= 0,0008$  con la prueba T Student.
- En los tres tiempos experimentales, el ancho trabecular del tejido óseo neoforado, en el grupo el Ca (HO)<sub>2</sub> es mayor que en los controles respectivos con diferencias estadísticamente representativas, tanto a los 7 como a los 15 y 30 días.
- En los tres tiempos experimentales (7-15 y 30 días) el número de células por mm<sub>2</sub> de superficie ósea neoforada, en el grupo el Ca (HO)<sub>2</sub> es menor que en los controles respectivos, al ser mayor en estos casos el ancho trabecular,

indicaría la gran actividad de las células. No existiendo diferencias estadísticamente significativa

- Comparando los efectos de ambos materiales entre sí, encontramos que el grupo tratado con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  el ancho trabecular del tejido óseo neoformado es mayor que el del grupo ALN. Presentando diferencia estadísticamente significativa en los tres tiempos experimentales. No existiendo diferencia estadísticamente significativa en referencia al número de células por  $\text{mm}^2$  de superficie ósea.
- Mejoran la densidad del tejido óseo lo cual se corroboró radiográficamente y con el programa Image Pro Plus-Surface Plot, que permite fácilmente medir la densidad óptica por diferencias de color.

El comportamiento de éstos materiales en animales de laboratorio nos permite proyectar nuevos estudios para poder realizar la traspolación a la clínica odontológica, lo que facilitaría su uso en el tratamiento de lesiones tanto osteolíticas, como en lesiones periodontales u ortodónticos.

**Esta investigación nos permite establecer los beneficios de utilizar el Hidróxido de Calcio, material osteoinductivo por su bajo costo y su uso extendido en odontología, cuando lo comparamos con el ALN que es costoso y difícil de obtener como droga pura.**



## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Adami S , Salvagno G, et al. Treatment of Payer's disease of bone intravenoes,4 amino 1 hidroxybutylidine-1,1. Bisphosphonate. Calcif Tissue Int.1986.39:226-229
- 2.- Altudal H The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99(3):285-91
- 3.- Baskar,SN. Patología Bucal. 1º Edición. Editorial Ateneo. Bs. As. 1971.
- 4.- [Bertó Botella, A.](#); [Miñana Gómez, M.](#); [Miñana Laliga, R.](#) ONJ (Osteonecrosis de los maxilares relacionada con bifosfonatos). Guía para el tratamiento y prevención en Endodoncia [Gaceta Dental: Industria y Profesionales, 2007 MAR; \(179\)](#)106-125
- 5.- Bloom W, Fawcett DW. Tratado de Histología 7º Edición Editorial Labor SA. Barcelona.
- 6.- Bornancini CA. Cicatrización post apicectomía. Contribución a su estudio. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología. UNC. 1991.
- 7.- Cabrini, RL. Anatomía Patológica Bucal. 1º reedición de la 1º edición. Editorial Mundi. Bs. As. 1988.
- 8.- Cabrini RL, Guglielmotti M, Almagro JC. Histomorphometry of inicial bone healing around zirconium implants in rat. Implant Dent. 1993. 2(4):264-267.
- 9.- Cabrini RL, Guglielmotti MB: Metodología para estimar la osteointegración de metales. Rev. Fac. Odont. UBA. 2001. (8): 19-24
- 10.- Camacho NP, et al A controlled study of the effects of alendronate in a growing mouse model of esteogénesis imperfecta. Calcif Tissue Int. 2001 ,69(2): 94-101.
- 11.- Chacon E, et al. Effect of Alendronate in endosseous implant integration: an in vivo study in rabbits. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2006,64(7): 1005-1009

- 12.- Chiapasco M et al. Spontaneous bone regeneration after enucleation of large mandibular cysts, a radiographic computed analysis of 27 consecutives cases. J. Oral Maxillofac. Surg 2000;58(9):942-8.
- 13.-Costa Ad. Uso do hidróxido do calcio no tratamento de dentes com lesões periapicais : relato clínico de 13 casos. Rev As Pav Cir Dent 1999; 35:220-26.
- 14.- Crosa M, Sacarponi A Respuesta tisular del Hidróxido de Calcio, probable mecanismo de acción. J. Dental Research. (Abstract speceed Issue)1983.
- 15.- Dal Pian Nobre M. et al Local action of alendronate in bone repair of spontaneously hypertensive rat (SHR). ARQ Bras: Cardiol. 2008,90(4): 239-246.
- 16.-Del Castillo Pardo de Vera, García de Marcos, Arroyo Rodríguez et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac . 2007;29 (5): 295-308.
- 17.- Diaz A Aplicación clínica de autoinjerto óseo y aloinjerto de hueso desmineralizado humano, en cavidades óseas de diferentes orígenes fisiopatológicos. Tesis Doctoral. Facultad de Odontología. UNC. 2003.
- 18.- Duarte P. et al. Alendronate therapy may be effective in the prevention of bone loss around titanium implants inserted in estrogen-deficient rats. J Periodontol 2005; 76(1):107-14,
- 19.- Dziak R. Biochemical and molecular mediators of bone metabolism. J. Periodontal. Supplement. 1993,407-415. Editorial Mundi. Bs. As. 1988.
- 20.- [Escobar López](#), EA. , [López López](#)J. , Et al. Osteonecrosis de los maxilares asociada a bifosfonatos: revisión sistemática. [Avances en odontoestomatología](#), ISSN , 2007; 23(2):91-101..
- 21.- Fernández-Tresguerres , Hernández-Gil , Alobera Gracia M A , et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11: 47-51.

- 22.- Ferro Benitez PP, et al. Tratamiento no quirúrgico de lesiones periapicales. Revista Cubana de Estomatología. 2005; 42 (2) :35-42.
- 23.- Fleiish H. Bisphosphonates history and experimental basic. Bone (NY) Ann Med. 1987;8:523-8.
- 24.- Fleiish H. Bisphosphonates in osteoporosis an introduction. Osteoporosis Int. Suppl 33.1993.3:33-5.
- 25.- Fleiish H. Bisphosphonates in bone disease for the laboratory to the patient. 3° edition. The Parthenon Publishig Group. Inc. London. 1997.
- 26.- Galvez Luis. Efecto biológico del fosfato tricálcico balanceado en los defectos óseos periapicales. Odontol. Sanmarquina. 1998;1(1):4-10 .
- 27.- Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Periodoncio de Inserción: Cemento, Ligamento Periodontal y Hueso Alveolar. En: Histología y embriología bucodental. Ed Médica Panamericana. Madrid, 2002, 2° Edición, pp 368-383.
- 28.- Gross,J:S: DDS: Bone Grafting Materials for Dental Applications: A Practical Guide. Compend. Contin. Educ. Dent. 1997, 18:18:10,1013-8,1020-2,1024
- 29.- Guglielmotti MB:GuerreroC and Cabrini RL. Chonodynamic evaluation of the stages of osteointegration un zirconium laminar. Implants. Acta Odont. Latinoamer. 1997. 10 (1): 11-23.
- 30.- [Hayami T](#), [Pickarski M](#), et al The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. [Arthritis Rheum](#). 2004;50(4):1193-206.
- 31.-Hsu FY, Chueh SC, Wang YJ. Microspheres of hidroxiapatite rescontituted collagen as supports for osteoblast cell growth. Biomaterials. 1999, 20 (20): 1931-6.

- 32.-Junqueira LC, Carneiro. Histología Básica. 3° Edición Editorial Salvat. Barcelona .España 1987.145-169.
- 33.- Kaynak D, Meffert R, et al. A Histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate Alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. J Periodontol. May 2000.790-796.
- 34.- Khosla S, Burr D, Cauley J, et al Osteonecrosis mandibular y bifosfonatos: Recomendaciones de la Sociedad Americana para la Investigación Ósea y Mental (ASBMR).. J Rev Méd Chile 2006; 134: 1161-1165 .
- 35.- Khosravi Shahi P, Díaz Muñoz de la Espada V. Bifosfonatos en oncología. An Med Interna (Madrid) 2005; 22: 544-547.
- 36.-Kitrilakis y Luchetti. Determinación del Grado de Oseointegración de Implantes Dentales en Pacientes Postmenopausicas. Carrera de Magister en Implantología Oral. Universidad Nacional de La Plata.Argentina.
- 37.- Krugger G. Cirugía Bucomaxilofacial. 5° edición Editorial Ateneo. Bs. As. 1987.
- 38.- Laskin DM. Cirugía Bucal y Maxilofacial. Editorial Médica Panamericana. Bs. As. 1987.
- 39.- Lehmann HJ. Et al Effects of bisphosphonates on cartilage turnover assessed with a newly developed assay for collagen type II degradation products. Ann Rheum Dis 2002.;61(6):530-3.
- 40.- Lesson TS, Lesson CR, P Aparo AA. T Yexto- Atlas de Histología . 1° Edición. Editorial Interamericana –MC Graw Hill. 1989.159-188.
- 41.- Lopez Arranz, JS: López Arranz –Monge, E. y de Vicente Rodríguez, J C. Regeneración tisular en defectos óseos adyacentes a implantes dentales. Estudio morfológico y ultraestructural. RCOE, 2000, 5(1)15-24.
- 42.- Luchetti, C; Ayala, M; Micinquevich, S; Medina, M. "A rat model to study bone regeneration" J. Dent. Res.2000, 79 (5):1028-189.

- 43.- Lyndon F. Cooper, Biologic determinants of bone formation for osseointegration: Clues for future clinical improvements J Prosthet Dent 1998;80:439-49
- 44.-[Maalouf NM](#), [Heller HJ](#), [Odvina CV](#), [Kim PJ](#), [Sakhaee K](#). Bisphosphonate-induced hypocalcemia: report of 3 cases and review of literature. 2006 ;12(1):48-53.
- 45.-[Madenci E](#), [Yilmaz K](#), [Yilmaz M](#), [Coskun Y](#) Alendronate treatment in osteogenesis imperfecta.. [J Clin Rheumatol](#). 2006 ;12(2):53-6.
- 46.- Maiti SK; Singh GR. Bone morphogenetic protein- novel regulators of bone formation. Indian J Exp Biol. 1998.36 (3): 237-244.
- 47.- Malika Sahni et al. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts . J Clin Invest. 1993;91 , 2004-2011.
- 48.- Mareque J, Ferrés E. Bisfosfonatos y osteonecrosis en los maxilares. Guía Clínica de aplicación en la CUO. Rev Oper Dent Endod 2007;5:61.**
- 49.- Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg 2003;61(9):1115-7.
- 50.- Merraw SJ, Reeve CM. Qualitative analysis of periodontal implant bone and influence of Alendronate sodium early bone regeneration. J Periodontol. 1999.1228-1233.
- 51.- Merraw SJ, Reeve CM. and Wilan ,PC. Use of Alendronate in Peri-implant Defect Regeneration. J. Periodontol. 1999,70 (3):151-8.
- 52.- Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. J Clin Oncol 2003; 21(22): 4253-4254.
- 53.- Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. Int J Oral Maxillofac Implants. 2003 ;18(2):218-23. .

- 54.- Patlas N. et al. Transplacental effects of biphosphonates on fetal skeletal ossification and mineralization in rats. *Teratology*,1999 ; 60(2):98-73.
- 55.- Porras Ag, Hooand SD, Gertz BJ. Pharmacokinetic. 1998. 38. 5: 315-28.
- 56.- Porras AG, Holland SD, Gertz BJ. Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet* 1999 36:5 315-28. .
- 57.-Reddy M, et al . Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in besgle dogs. *J. Periodontol.* March 1995. 66 (3).211-217.
- 58.- Reddy GI, Kumar TM, Veena KM. Formulation and evaluation of alendronate sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in periodontitis. *Drug Deliv.* 2005; 12 (4): 217-22.
- 59.- Reeve Charles Qualitative of peripheral peri-implant bone and influence of Alendronate sodium on early bone regeneration. *Journal of Periodontology.* 1999. 70. 10 1228-1233.
- 60.- Rodan GA, Seedor JG and Balena R Preclinical Pharmacology of Alendronate. *Osteoporosis Int. Suppl.* 1993. 3: 57-12.
- 61.- Saturu Naral, Shunichiro Nagahata. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *J Oral Maillofac Implnts* 2003; 18:218-223
- 62.- Sahni M, Guenther H, et al. Bisphosphonates act on rat bone resorption thorough the mediation of osteoblast. *J. Clin Invest.* 1993. 91: 2004-1
- 63- Sajeda M, et al. Bone remodelling. *British Dental Journal* 1992. 235-241.
- 64.- [Sen C](#), [Gunes T](#), [Erdem M](#), [Koseoglu RD](#), [Filiz NO](#). Effects of calcitonin and alendronate on distraction osteogenesis. [Int Orthop.](#) 2006 ; 8:455-462
- 65.- Strewler Gordon J. Local and systemic control of the osteoblast *J Clin Invest.* 2001; 107(3): 271-272
- 66- Sharon Stevenson, DVM, PhD. Biology of Bone Grafos. *Orthopedic Clinics of North American.* 1999. 30.4:543-551.

- 67- Siris E. Alendronate in the treatment of osteoporosis a review of clinical trial. *J Womens Health Gen Based Med.* 1999;9:6:599-606.
- 68.- Souza V, Bernabe PF, Holland R, Nery M, Mello W. Tratamento no quirúrgico de dentes com lesões periapicais. *R.B.O.* 2001;46(2):39-46.
- 69.- [Tabuchi M](#), [Miyazawa K](#), [Kimura M](#), [Maeda H](#), [Kawai T](#), [Kameyama Y](#), [Goto S](#) Enhancement of crude bone morphogenetic protein-induced new bone formation and normalization of endochondral ossification by bisphosphonate treatment in osteoprotegerin-deficient mice. *Calcif Tissue Int.* 2005;77(4):239-49.
- 70.-Tenenbaum Hc, et al. Bisphosphonates and periodontic:potential applications regulation of bone mass in the periodontum and other therapeutic/diagnostic uses, *J periodontol.* 2002;73(7):813-22.
- 71.-Timoleón Anguita C, Jaime Agurto P, Iván Roa E, German Laissle C. Osteonecrosis associated with the use of bisphosphonates: Case report *Bone Miner Res.* 2007;22:1479-1491
- 72.-Tokugawa Y, Shirota T, Ohno K, Yamaguchi A. Effects of bisphosphonate on bone reaction after placement of titanium implants in tibiae of ovariectomized rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(1):66-74.
- 73.- Stevenson. Biology of bone grafts. *Orthopedic Clinic of North America* 30:4-1999.
- 74.-Venturelli A Regeneración ósea : Plasma rico en plaquetas. *RAOA* 87 -6 .1999. 459-467.
- 75.-Whyte MP, Wenkert D, Clements KL, McAlister WH, Mumm S. Bisphosphonate-induced osteopetrosis [brief report]. *N Engl J Med.* 2003;349:457-63.
- 76.-Yaffe A, Fine N et al . The effect of Bisphosphonates in Alveolar Bone Resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol.*1995,66(11):999-1003.



77- Yaffe A, Golomb G, Breuer E and Binderman I The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. J Periodontol. 2000;71: 1607-1612.

78- Zerbo I, et al Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. Clin Oral Impl Research . 2001; 12:379-384.