



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DIFERENTES MEMBRANAS  
REABSORBIBLES UTILIZADAS PARA REGENERACIÓN ÓSEA  
GUIADA”**

**TESISTA:**

**OD. ESP. GUILLERMO ENRIQUE DEDOSSI**

**DIRECTOR:**

**PROF. DR. ENRIQUE FERNÁNDEZ BODEREAU**

**CÓRDOBA, 2020**



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



**Universidad Nacional de Córdoba**

**Facultad de Odontología**

**Escuela de Posgrado**

**Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Odontología**

Estudio comparativo entre diferentes membranas reabsorbibles  
utilizadas para Regeneración Ósea Guiada.

Od. Esp. Guillermo Enrique Dedossi

Director Prof. Dr. Enrique Fernández Bodereau

Año 2020

## **Comisión de tesis**

Prof Dr Enrique Fernandez Bodereau

Prof Dr Pablo Naldini

Prof. Dr. Ricardo Fretes

## **Tribunal de Tesís**

Prof. Dr. Andres Santa Cruz

Prof. Dr. Ricardo Fretes

Prof. Dr. Pablo Naldini

## Dedicatoria

- *A mis padres Juan Carlos Dedossi y Fanni Piedad Garcia.*

- *A mis hijos Micaela, Agustina y Juan.*

## Agradecimientos

- *Al Prof. Dr. Enrique Fernandez Bodereau.*
- *A la Méd. Veterinaria Dra. Cecilia Luciano.*
- *Al Dr. Mauro Valente y su equipo del Laboratorio LIIFAMIR de la Facultad de Astronomía, Matemática y Física de la Universidad Nacional de Córdoba.*
- *Al Méd. Veterinario Dr. Cristian Germiniani.*
- *Al Ing. Luis Croharé.*
- *Al Prof. Dr. Ismael Rodríguez.*
- *Al Prof. Dr. Ricardo Fretes*

## Certificado del Comité de Ética



Por la presente, el que suscribe, Dr. Eduardo J. Picco, Secretario de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, **deja constancia**, que el Protocolo, cuyo título es "Estudio comparativo entre diferentes membranas reabsorbibles utilizadas para R.O.G", identificado con número de protocolo 195/14, fue aprobado por el Comité Asesor de Ética y Bioseguridad, según consta en los archivos de esta Secretaría, el día 27 de noviembre de 2014.

Se extiende el presente certificado, a los fines de ser presentado ante quien corresponda, en la ciudad de Esperanza, provincia de Santa Fe, República Argentina, a los veintisiete días del mes de noviembre de 2014.



Dr. Eduardo J. Picco  
SECRETARIO DE CIENCIA Y TÉCNICA  
Facultad de Cs. Veterinarias (UNL)

Universidad Nacional del Litoral  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Secretaría de Ciencia y Técnica  
cytecnica@fcv.unl.edu.ar

R.P. Luis Kreder 2895 53080HOF  
Esperanza  
Tel: 54-03496-420639 (int 105)  
Fax: 54-3496-426304

Aval del Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Litoral.

**ÍNDICE GENERAL**

PORTADA .....	I
COMISIÓN de TESIS .....	II
DEDICATORIA .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
CERTIFICACIONES .....	V
ÍNDICE .....	VI
RESUMEN .....	VII
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
Estudios micro tomográficos .....	17
Estudios Histomorfométricos .....	24
Análisis estadísticos .....	26
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
Resultados micro tomográficos .....	28
Resultados histomorfométricos .....	29
Densidad radiográfica relativa .....	43
Histomorfometría de tejido duro .....	49
Histomorfometría de tejido óseo neo formado .....	53
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>74</b>



# RESUMEN

## RESUMEN

El propósito del presente estudio es analizar el comportamiento de diferentes membranas reabsorbibles para Regeneración Ósea Guiada de producción nacional y establecer cuales brindan los mejores resultados, en un modelo animal, *Oryctolagus cuniculus*, raza neozelandesa.

**Materiales y Métodos:** Se practicaron defectos óseos críticos en las calotas craneanas de los especímenes (n=80), la mitad de los defectos fueron rellenados con injerto óseo xerográfico y la otra mitad sin material agregado. Fueron cubiertos los defectos con cuatro diferentes membranas reabsorbibles y un grupo no llevo membrana (control). Se sacrificaron a las 4 y 8 semanas. Se realizaron estudios micro tomográficos de alta resolución a las muestras fijadas y luego estudios histomorfométricos.

**Resultados:** Se verificaron diferencias significativas entre las membranas utilizadas ( $p=0,005$ ;  $p<0,05$ ), con valores medios de densidad radiográfica significativamente menores en los grupos con membrana de pericardio y sin membrana respecto a los grupos con membranas *amniocoriónica*, de *colágeno* y *fascia lata*. Con respecto al factor tiempo, en términos globales no resultó significativo ( $p=0,614$ ;  $p>0,05$ ). Histológicamente, el factor material de relleno mostró un efecto muy significativo (el más significativo) sobre la densidad de tejido óseo neo formado y/o material de relleno residual ( $p=3,0 \times 10^{-11}$ ;  $p<0,05$ ), también el efecto del factor membrana resultó muy significativo ( $p=4,5 \times 10^{-9}$ ;  $p<0,05$ ).

**Conclusiones:** Existen diferencias significativas de rendimiento en cuanto a calidad y cantidad de hueso debajo de las diferentes membranas estudiadas. Se observó pobre rendimiento en los grupos sin membrana y con membrana de pericardio porcino, y mejores rendimientos en los grupos de membranas amniocoriónicas humanas, fascia lata humana y de colágeno reconstituido.

Se destaca la validación de ambos métodos, micro-tomografía de alta resolución e Histomorfometría para este tipo de trabajo y la correlación de resultados entre ellos.

## SUMMARY

The purpose of the present study is to analyze the behavior of different reabsorbable membranes for Guided Bone Regeneration of national production and establish which provide the best results, in an animal model, *Oryctolagus cuniculus*, New Zealand rabbits.

**Materials and Methods:** Critical bone defects were performed in the cranial calves of the specimens (N=80), half of the defects were filled with xerographic bone graft and the other half without added material. Defects were covered with four different resorbable membranes and one group had no membrane (control). They were sacrificed at 4 and 8 weeks. High resolution micro tomographic studies were performed on the fixed samples and then histomorphometric studies.

**Results:** Significant differences were found between the membranes used ( $p=0.005$ ;  $p<0.05$ ), with significantly lower radiographic density mean values in the groups with pericardial membrane and without a membrane compared to the groups with amniochorionic, collagen membranes and fascia lata. Regarding the time factor, in global terms it was not significant ( $p=0.614$ ;  $p>0.05$ ). Histologically, the filling material factor showed a very significant effect (the most significant) on the density of newly formed bone tissue and / or residual filling material ( $p=3.0 \times 10^{-11}$ ;  $p<0.05$ ), also the effect of Membrane factor was very significant ( $p=4.5 \times 10^{-9}$ ;  $p<0.05$ ).

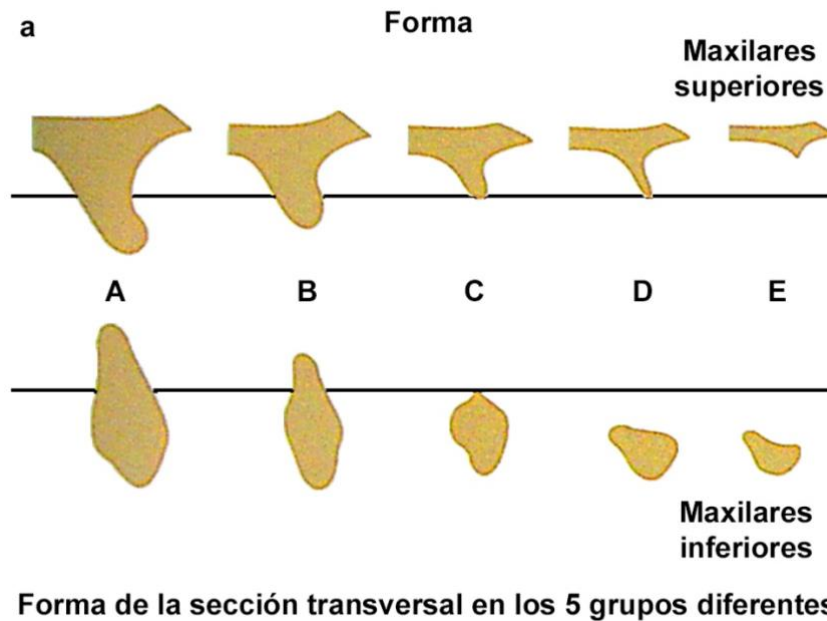
**Conclusions:** There are significant differences in performance in terms of quality and quantity of bone under the different membranes studied. Poor performance was observed in the groups without membrane and with porcine pericardium membrane, and better yields in the groups of human chorionic anion membranes, human fascia lata and of reconstituted collagen.

The validation of both methods, high resolution micro tomography and histomorphometric for this type of work and the correlation of results between them are highlighted.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Consecuentemente a las pérdidas dentarias, los rebordes alveolares, que se conforman a partir de los dientes y existen por y para ellos, sufren una pérdida de volumen. Mayor pérdida cuanto mayor sea el tiempo transcurrido desde la pérdida dentaria, pudiendo llegar a una pérdida total del reborde alveolar, dejando a los pacientes solamente con los huesos basales de los maxilares. También siendo influenciada dicha pérdida por el tipo de evento que originó la pérdida dentaria, sea esta infecciosa, traumática o combinada. (1)



**Fig. 1.-** Clasificación según la forma del hueso residual de los maxilares según Lekholm y Zarb (1985)

La recuperación del volumen perdido resulta fundamental para lograr prótesis que además de funcionales, sean estéticas, confortables y de fácil mantenimiento.

Existen una amplia variedad de técnicas quirúrgicas de adición de biomateriales tendientes a producir la regeneración ósea para recuperar el volumen óseo perdido de los rebordes maxilares. (2,3,4)

En muchas de estas técnicas de mantenimiento o recuperación del volumen óseo perdido se utilizan membranas biológicas de las cuales existe una amplia gama comercial. Se dividen en dos grandes grupos las no reabsorbibles y las reabsorbibles, algunas de ellas ampliamente documentadas y otras escasamente documentadas. (5,6,7)

Esta división entre no reabsorbibles y reabsorbibles hace alusión a la capacidad del organismo de fagocitar-disgregar o no a estos materiales, lo cual ha hecho proliferar el segundo grupo (reabsorbibles) porque con su uso no es necesaria una segunda cirugía para la extracción de la misma, luego de que esta ha cumplido su cometido.

El consenso del *International Team for Implantology* (ITI) de 2009 concluye que es difícil o imposible determinar que un procedimiento quirúrgico ofrece un mejor resultado que otro, por la previsibilidad del aumento y las tasas de supervivencia y éxito de los implantes colocados en el sitio aumentado, cualquier procedimiento quirúrgico presenta ventajas y desventajas y debe ser cuidadosamente evaluado antes de la cirugía, en definitiva se debe dar prioridad a los procedimientos que son más simples y menos invasivos, implican un menor riesgo de complicaciones y alcanza sus metas en un menor lapso de tiempo. (8)

Así mismo concluye el consenso ITI de 2013 que procedimientos de aumento óseo simultáneos y en una etapa previa a la colocación del implante, se asocian con una Alta tasa de éxito y supervivencia los implantes, el nivel de evidencia sin embargo es mejor para los procedimientos por etapas. (9)

Entre los diferentes métodos de aumento óseo la Regeneración Ósea Guiada (ROG) es la más popular y la mejor documentada para el tratamiento de los defectos óseos localizados en los maxilares, probablemente debido a su relativa simplicidad de uso, y menor morbilidad del paciente, en la mayoría de los casos, se ha demostrado que son comparables las tasas de éxitos de implantes colocados en sitios tratados con regeneración ósea guiada y sitios sin aumento óseo. (10)

La regeneración titular guiada se introdujo en la práctica clínica dental hace más de 40 años desde que Melcher *et.al.* en 1970, seguido de Karring *et. al.* 1980 y Nyman *et. al.* en 1980, presentó sus principios básicos, a la comunidad profesional.

Los mecanismos de regeneración ósea guiada siguen los mismos principios generales de la regeneración titular guiada es decir que “bajo ciertas condiciones las células que se originan de los tejidos adyacentes a un espacio que se proporciona exclusivamente para tal fin, son capaces de formar los mismos tejidos”.

A fin de permitir la repoblación exclusiva de las células de los tejidos deseados en ese espacio se debe impedir el acceso de las células de los otros tejidos vecinos indeseados utilizando barreras comúnmente conocidas como membranas.

La regeneración ósea guiada permite el crecimiento del tejido óseo en forma selectiva en un espacio mantenido por barreras de tejidos. (11)

Ya en 1994, Hardwitch *et.al.*, (2) describieron las características que deben cumplir las membranas utilizadas para regeneración ósea guiada, a saber:

- Biocompatibilidad:

Este término define la capacidad de un material que, aplicado en un huésped, genera en este una respuesta apropiada. Se caracteriza según diferentes parámetros, entre ellos, citotoxicidad, mutagenicidad y efecto anti microbial.

Los materiales biodegradables liberan subproductos en los tejidos circundantes del huésped que tienen como consecuencia reacciones adversas locales y sistémicas. El producto final

del proceso de degradación debe ser en sí mismo benigno y los subproductos intermedios tienen que ser tenidos en cuenta y controlados en el diseño inicial del material. (12)

- Oclusión celular

El propósito primario que caracteriza a una membrana es la oclusión celular, que es la capacidad de excluir las células del tejido conectivo en la región donde se intenta realizar la regeneración ósea. Asimismo, otros factores locales, como un adecuado aporte vascular y cantidad adecuada de células osteogénicas son de igual importancia para la regeneración ósea guiada que la oclusión celular provista por la membrana de barrera. (13, 14, 15, 16)

- Integración tisular

La topografía de la superficie, porosidad y propiedades químicas de la membrana determinan primariamente si durante la cicatrización ocurre un ligado con los tejidos.

Un biomaterial no poroso y no texturizado implantado en tejido blando deriva en la formación de una capsula fibrosa que lo cubre y no se adhiere directamente al material, lo que produce una disminución del soporte mecánico en la herida durante el período de cicatrización. (17)

- Fabricación y mantenimiento del espacio

Es la capacidad de la membrana de crear y mantener suficiente volumen y el espacio geométrico y también la capacidad de resistir colapsarse bajo condiciones vitales durante el período de cicatrización.

Las membranas biodegradables van perdiendo rigidez mecánica a medida que se van degradando, por lo cual resulta fundamental que el tiempo de permanencia con su estructura intacta sea por lo menos equiparable al tiempo necesario para la formación de la matriz ósea en procedimientos de regeneración ósea guiada. (18)

- Manejo clínico durante la cirugía

Durante la cirugía las membranas son frecuentemente recortadas, adaptadas y moldeadas para ajustar y cubrir el área aumentada. Para que este procedimiento se complete en un tiempo adecuado las membranas deben ser de fácil manipulación.

Las membranas biodegradables especialmente las de colágeno son adecuadamente maleables y a causa de su hidrofiliidad se adhieren al sustrato óseo y de material de injerto tan pronto como se empapan con sangre. (19)

- Limitada propensión a las complicaciones

Las membranas reabsorbibles tienen problemas cuando se exponen prematuramente con infección y requieren ser removidas ya que la fragmentación y la consecuente pérdida de integridad del material hace difícil la remoción de la totalidad de los remanentes de la membrana.

En ocasiones pueden ocurrir reacciones de cuerpo extraño e inflamación con las membranas reabsorbibles a base de polímeros sintéticos.

Existen una amplia variedad de estudios donde se comparan membranas reabsorbibles con no reabsorbibles y reabsorbibles entre sí, tratando de evaluar la eficacia de las mismas en el proceso de regeneración ósea guiada, y si existen diferencias significativas entre ellas. Pero no todas las membranas se encuentran disponibles en todos los territorios. (20,21,22,23)

Como conclusión, la membrana de colágeno juega un papel importante en la cicatrización de los defectos óseos, por qué el hueso crece más rápidamente en el lecho cubierto por una membrana. (24)

Para el presente estudio, se decidió utilizar diferentes membranas de fabricación nacional que se encuentran en el mercado odontológico local y también una membrana de colágeno de fabricación norteamericana, de reconocida utilidad.

Cada laboratorio o banco de tejidos realiza procedimientos para la obtención del producto final que comercializa, en este caso membranas reabsorbibles, estos procedimientos le son propios y son parte de su patente o marca comercial, lo que termina dando las características del producto.

Por lo tanto, es posible que membranas del mismo tipo y origen, pero de diferentes laboratorios, presenten resultados dispares.

Allí nos encontramos con importante cantidad de investigaciones que refieren al tipo y origen de las membranas, pero las involucradas en el presente estudio no cuentan con estudios específicos o estos son escasos, al momento de comenzar el presente trabajo.

Las membranas a comparar en el presente estudio son las siguientes:

#### 1- Membrana de colágeno bovino tipo I, reconstituido de fibras largas.

El colágeno es una proteína fibrosa y constituye el mayor componente proteico de la piel, hueso, tendones, ligamentos, cartílago, membranas basales y otras formas de tejido conectivo. Es la proteína más abundante en el reino animal. Se utilizará para el presente trabajo una membrana de colágeno bovino de nombre comercial Mem-Block (Collagen Matrix, Inc., de BioHorizons, Birmingham, USA), esterilizada mediante radiación ionizante. La cual es una membrana de reconocido prestigio internacional (25,26, 27, 56, 57)

#### 2- Membrana de pericardio porcino descelularizada.

Hipoalergenizada y esterilizada mediante radiación ionizante. Tejido blando natural reabsorbible, con alta hidrofiliidad. Poseen alta resistencia a la fuerza multidireccional y rotura y acepta suturas e instrumentos de fijación. La membrana de pericardio es impermeable a células, pero permeables a nutrientes. Se degrada enzimáticamente. Se utilizará para el presente trabajo una membrana de pericardio porcino de nombre comercial Tissum (Fundación InBiomed, ingeniería biomédica, Córdoba, Argentina). (28,29,30)

#### 3- Membrana Amnio-coriónica.



Es uno de los biomateriales más antiguos. Fue utilizado por primera vez para trasplante de piel en 1910 y puede ser de origen humano o animal. (31)

Entre otras propiedades se destaca: efecto anti-inflamatorio, anti-microbial, anti-fibrosis, anti-queloides, una razonable propiedad mecánica y baja inmunogenicidad. (32,33)

Se utilizará para el presente trabajo una membrana amnio-coriónica de origen humano, de nombre comercial Tissum (Fundación Inbiomed, banco de tejidos, Córdoba, Argentina)

#### 4- Membrana de Fascia lata.

Membrana de tejido conectivo fibroso de origen humano, atóxica, esterilizada y liofilizada de la que se han eliminado las proteínas solubles y las grasas, constituida por paquetes de fibras colágenas orientadas en un patrón ondulado paralelo a la dirección de tracción del músculo.

Posee alta resistencia a la rotura traccional y acepta medios de fijación y suturas. El tiempo de hidratación es mayor que el necesario para las membranas de colágeno reconstituido, siendo el mismo de 10 a 15 minutos para su completa hidratación. (23)

Se degrada, como todas las membranas de colágeno tipo 1, mediante la enzima proteolítica específica, colagenasa y es resistente a las demás enzimas proteolíticas no específicas. (34)

Se utilizará para el presente trabajo una de nombre comercial Ostium (fundación Biotar, banco de tejidos, Rosario, Argentina)

También se estudiará un grupo sin membrana agregada, como control negativo.

Se decidió realizar el presente estudio en conejos, *Oryctolagus cuniculus*, raza neozelandesa, por ser estos de mayor jerarquía biológica que las ratas y contar para la realización de las pruebas con el apoyo de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Paraná, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Se definió el tiempo de duración de la prueba en 4 y 8 semanas, dado que gracias al metabolismo acelerado de la especie, los tiempos de cicatrización, reabsorción y remodelación son más cortos que en los humanos, parámetros establecidos por Sohn et al en su trabajo "Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes" de 2010, quien aconseja el periodo de 4 semanas para evaluar estabilidad de los materiales injertados y respuesta del huésped y de 8 semanas para evaluar la incorporación del injerto al tejido óseo neo formado, reabsorción del material, remodelación ósea y cantidad de hueso generado. (35)

Los resultados obtenidos en animales de experimentación pueden ser extrapolados solamente en parte a los seres humanos, por ello es que luego del estudio *in vitro* y en animales se pasa a una fase de estudio en humanos para corroborar los resultados y su aplicabilidad.

De todas formas, el presente trabajo refiere a comparación entre diferentes elementos entre sí en un denominador común, especie biológica, y en idénticas condiciones, lo que nos permite argumentar cuales de los objetos estudiados da mejores resultados y cuales peores, para los parámetros de este estudio.

# **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Las membranas estudiadas en el presente proyecto pueden tener diferencias significativas entre sí en cuanto al rendimiento referente a cantidad y calidad de hueso nuevo formado bajo ellas en el proceso de regeneración ósea guiada.

# OBJETIVOS DEL PROYECTO

**OBJETIVOS DEL PROYECTO**

**A.-** Cuantificar las posibles diferentes mineralizaciones producidas en defectos en calotas craneanas de *Oryctolagus cuniculus*, raza neozelandesa empleando 4 diferentes membranas reabsorbibles, con y sin el agregado de injerto óseo, en dos periodos de cicatrización diferentes y con control negativo sin membrana.

**B.-** Identificar la composición tisular y comparar su composición porcentual del relleno de defectos en calotas craneanas de *Oryctolagus cuniculus*, raza neozelandesa, facilitado por 4 tipos diferentes de membranas reabsorbibles, con y sin el agregado de injerto óseo, en dos periodos de cicatrización diferentes y con control negativo sin membrana.

# **MATERIALES Y METODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Conceptos éticos

El presente estudio cuenta con el aval del Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, protocolo N° 148/12, y con la autorización –por parte del director del Centro Regional Entre Ríos del INTA– para su realización en las instalaciones de la Estación Experimental Agropecuaria Paraná. (ANEXO 1 y 2)

### Metodología general

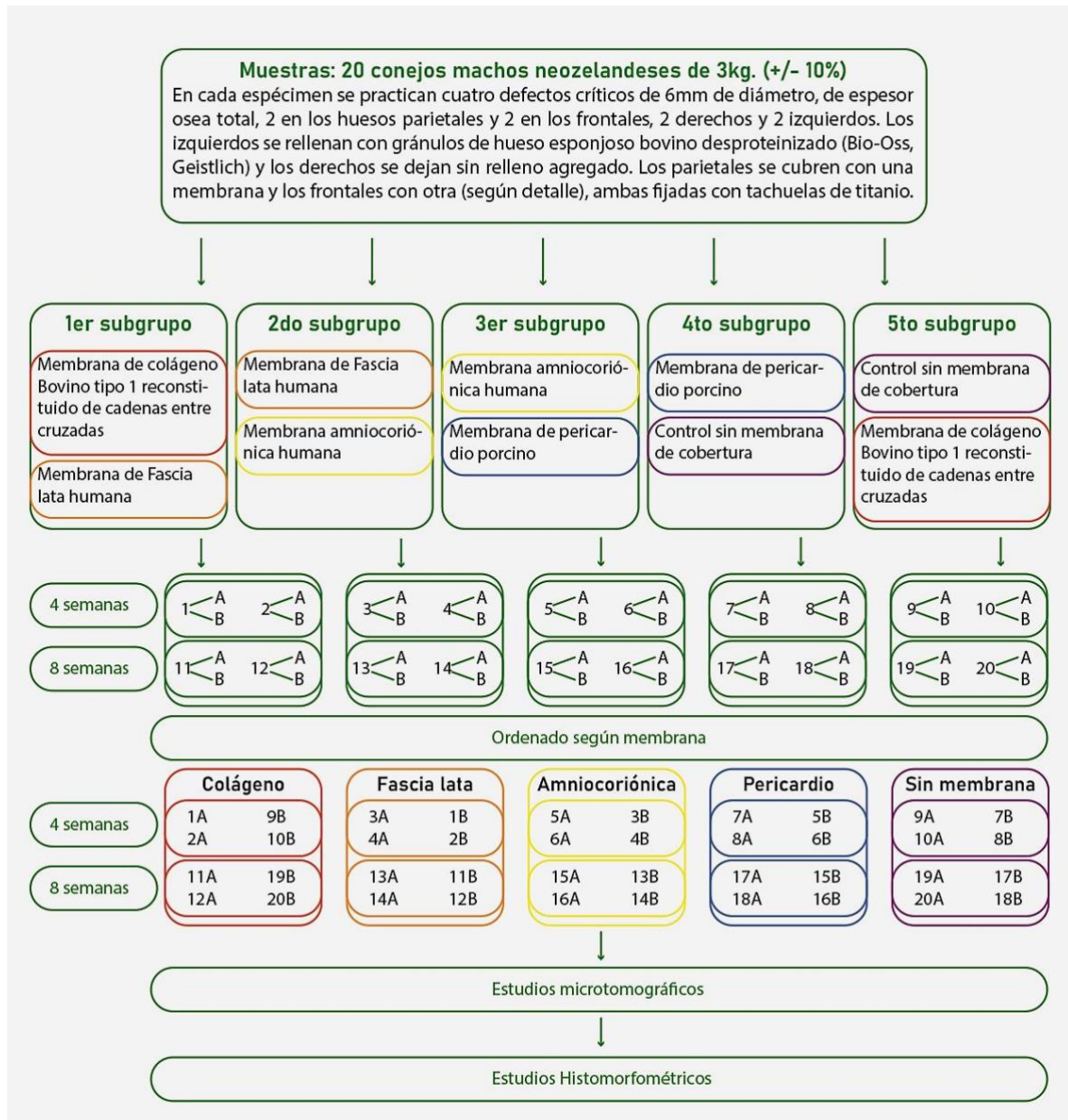
El grupo de estudio estuvo integrado por 20 conejos (*Oryctolagus cuniculus*), raza neozelandesa, machos, con un peso promedio de 3 kg.



**Figuras 2 y 3.-** Instalaciones del Área de Cunicultura del EEA Paraná del INTA



Se diseñó el siguiente esquema de procedimiento:



Con este diseño, se cumple con la premisa de utilizar la mínima cantidad necesaria de animales para experimentación y obtenemos 4 muestras diferentes en cada espécimen ya que no se trata de muestras duplicadas, sino de muestras diferentes en un mismo huésped. De esta forma, utilizando 20 animales de experimentación, tenemos un N de 80 muestras, 40 para un periodo de tiempo, 4 semanas (20 con relleno agregado y 20 sin relleno agregado) y 40 para el otro periodo de tiempo, 8 semanas (20 con relleno y 20 sin relleno agregado). (36)

En todos los especímenes se procedió a realizar 4 defectos críticos de 6 mm de diámetro en la calota craneana –2 en zona frontal derecha e izquierda, y otros 2 en zona parietal derecha e izquierda–, de espesor total, con trefina y guía quirúrgica. (10,15,16)

Los animales fueron pre medicados con 0,4 ml de xilacina y anestesiados con 0,3 ml de ketamina y 0,2 ml de dexametasona –todo de forma parenteral–, más 0,2 ml de xilacina de forma endovenosa, en la vena auricular, con lo que se obtuvo de 30 a 40 minutos de anestesia general en los especímenes. (37)

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

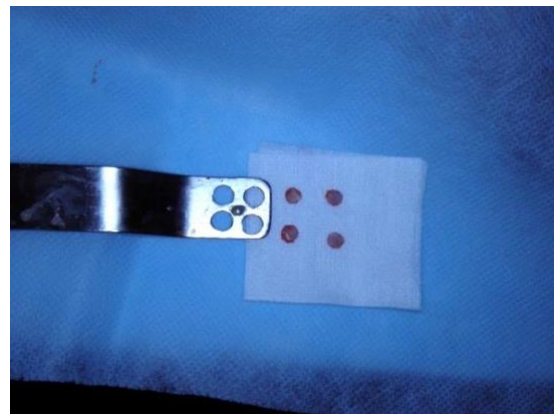
Se inició la cirugía con una incisión, con hoja de bisturí N° 15, de forma semicircular, con su concavidad en dirección caudal, cortando piel, tejido subcutáneo y periostio. La incisión se extendió desde 1 cm caudal del arco superciliar derecho a 1 cm caudal del arco superciliar izquierdo. Se procedió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

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

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



**Fig. 4.-** Defectos generados con trefina de 6 mm de diámetro



**Fig. 5.-** Guía quirúrgica y bloques óseos retirados de los

En todos los especímenes se siguió este patrón: los defectos izquierdos del animal se rellenaron con Bio-Oss, Geistlich gránulos de hueso esponjoso bovino desproteínizado, tamaño de partícula pequeño. A fin de no comprimir la duramadre del espécimen y de que en todos los casos la cantidad utilizada para rellenar el defecto sea la misma, se fabricó una

cuchara de muestra, la que se enrasaba antes de cada colocación con el relleno óseo hidratado con suero fisiológico; y los defectos derechos del animal se dejaron vacíos (no se agregó material alguno).

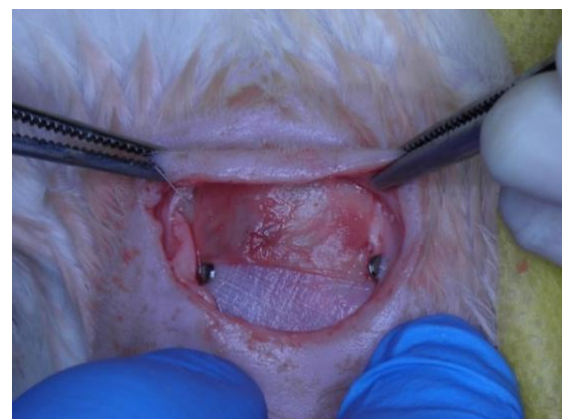


**Fig. 6.-** defectos derechos vacíos e izquierdos rellenados con Bio-Oss (flechas rojas)

Se procedió por subgrupo a colocar y fijar con tachuelas cortas de titanio (Titantec, Proantec SA., Buenos Aires, Argentina), así para el subgrupo 1 se cubrieron los defectos de zona parietal con membrana de colágeno reconstituido (Mem-Blok), y los de zona frontal con membrana de fascia lata humana. Para el segundo subgrupo, se cubrieron los defectos de la zona parietal con membrana de fascia lata humana y los de zona frontal con membrana amniocoriónica humana. Para el tercer subgrupo, se cubrieron los defectos de la zona parietal con membrana amniocoriónica humana y los de zona frontal con membrana de pericardio porcino. Para el cuarto subgrupo se cubrieron los defectos de la zona parietal con membrana de pericardio porcino y los de zona frontal no fueron cubiertos por membrana. Para el quinto subgrupo, no se cubrieron los defectos de zona parietal y los de zona frontal se cubrieron con membrana de colágeno reconstituido.



**Fig. 7.-** espécimen del subgrupo 4, con cobertura de membrana de pericardio porcino en los defectos parietales y sin cobertura en los defectos frontales.



**Fig. 8.-** espécimen del subgrupo 3, con cobertura de membrana amniocoriónica en los defectos parietales y de membrana de pericardio en los frontales.

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

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

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

Tras cuatro semanas, se procedió al sacrificio de la mitad de los especímenes de la siguiente forma: concusión y exanguinación. (36,37)

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

A ocho semanas de la cirugía, se sacrificó a la totalidad de los especímenes intervenidos siguiendo el protocolo antes descripto, se retiraron las calotas craneales, y se etiquetaron y fijaron para la realización de los análisis microtomográficos (Figs. 9, 10 y 11).



**Fig. 9.-** Calota craneana fijada y marcada para recortar.



**Fig. 10.-** Calota recortada



**Fig. 11.-** Vista del espesor de la calota y tejidos blandos circundantes

**Para lograr objetivo A****Estudios microtomográficos.**

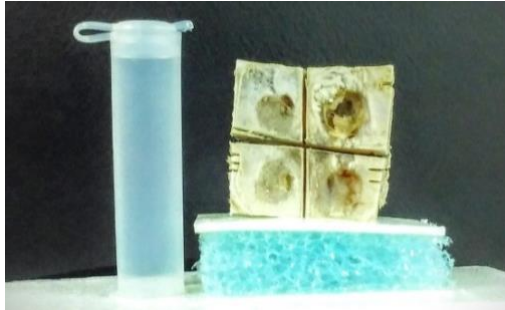
Las muestras fijadas, cortadas y marcadas fueron estudiadas en el laboratorio LIIFAMIR de la Facultad de Astronomía, Matemática y Física de la universidad Nacional de Córdoba, donde se sometieron a radiación de rayos x a fin de obtener 800 imágenes bidimensionales para pasos de 0,45 grados sobre un flat panel para reconstrucción tomografía completa, desde dónde se obtuvieron los cortes tomográficos seriados tangenciales, transversales, y axiales, así como visualizaciones tridimensionales del volumen reconstruido con lo que se evaluó el volumen de material mineralizado presente en cada defecto generado, lo que nos permitió establecer la cantidad de reparación en cada muestra

Cada muestra fue sometida a estudio microtomográfico de alta resolución, en el que se utilizó como fuente de radiación un tubo convencional de rayos X con potencia de 3 kW de alta estabilidad (Siemens Kristalloflex®, Alemania). El sistema de posicionamiento es un dispositivo mecánico-electrónico de control automatizado, con grados de libertad sincronizados. La detección se llevó a cabo de manera digital y directa, con un detector de alta resolución de tipo flat-panel certificado PaxScan® modelo 2020 (Varian, Salt Lake City, UT, Estados Unidos). El procesamiento de datos se realizó con la licencia oficial 3407-8985-4332-9223-7919 de la plataforma MatLab (The Math Works®, Natick, MA, Estados Unidos) (Fig. 12).

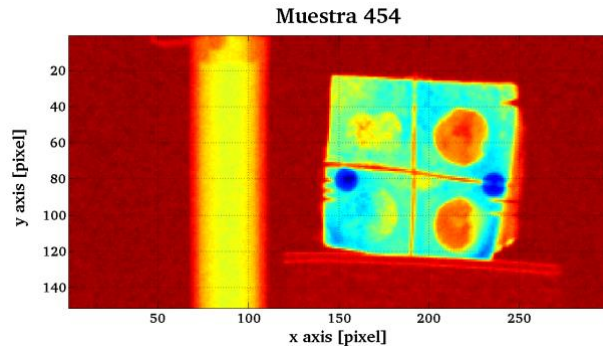


**Fig. 12.-** posicionamiento de las muestras en el dispositivo para la obtención de las imágenes radiológicas.

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



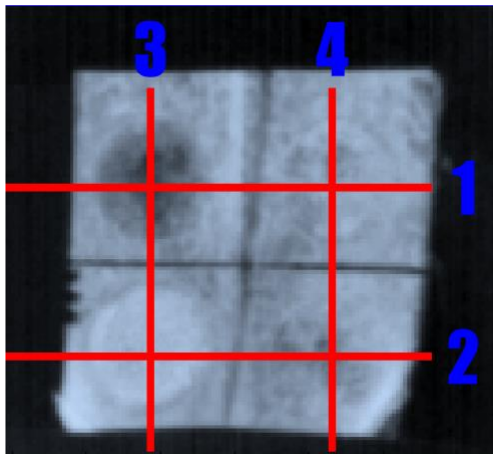
**Fig. 13.-** Muestra 454 con el tubo que contiene agua.



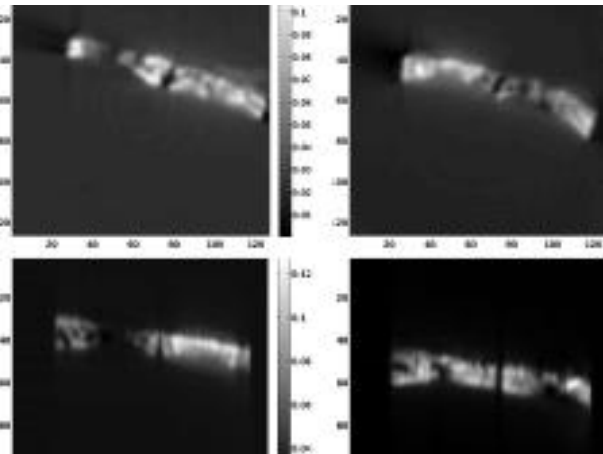
**Fig. 14.-** Imagen radiológica de la muestra 454. (Pseudo color asignado en función de densidad Rx, rojo menos denso, azul más denso).

Junto a cada muestra estudiada se posicionó un tubo con agua desmineralizada, a fin de obtener un patrón conocido que permitiera estandarizar todas las muestras.

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



**Fig. 15.-** Radiografía frontal de la muestra.



**Fig. 16.-** Cortes señalizados. Imagen 1 (arriba-izquierda), imagen 2 (arriba-derecha), imagen 3 (abajo-izquierda) e imagen 4 (abajo-derecha).

La determinación de la morfología se establece a partir de las propiedades físicas y espaciales de la absorción/transmisión de radiación de la muestra. Se calcula de la

distribución espacial de la densidad electrónica  $\rho_e$ , que es proporcional a la densidad másica  $P$ , por medio de coeficientes de absorción  $\mu_{abs}$ , obtenido de mediciones de la intensidad de radiación que transmite la muestra ( $J(x)$ ) respecto de la incidente ( $J(x = 0)$ ):

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

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

El ensayo se completa con el procedimiento de reconstrucción tomográfica:

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

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

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

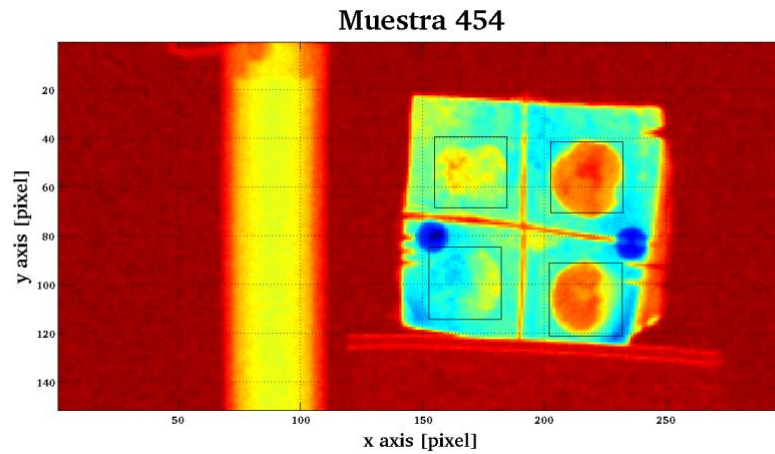
$$\mu = \rho_m \frac{N_A}{A}$$

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

Es importante recordar que estamos midiendo densidad radiológica, por lo cual, cuando el material de relleno empleado en el defecto sea más radiopaco que el hueso nativo del espécimen, se obtendrá una mineralización mayor al 100%. (38)

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

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

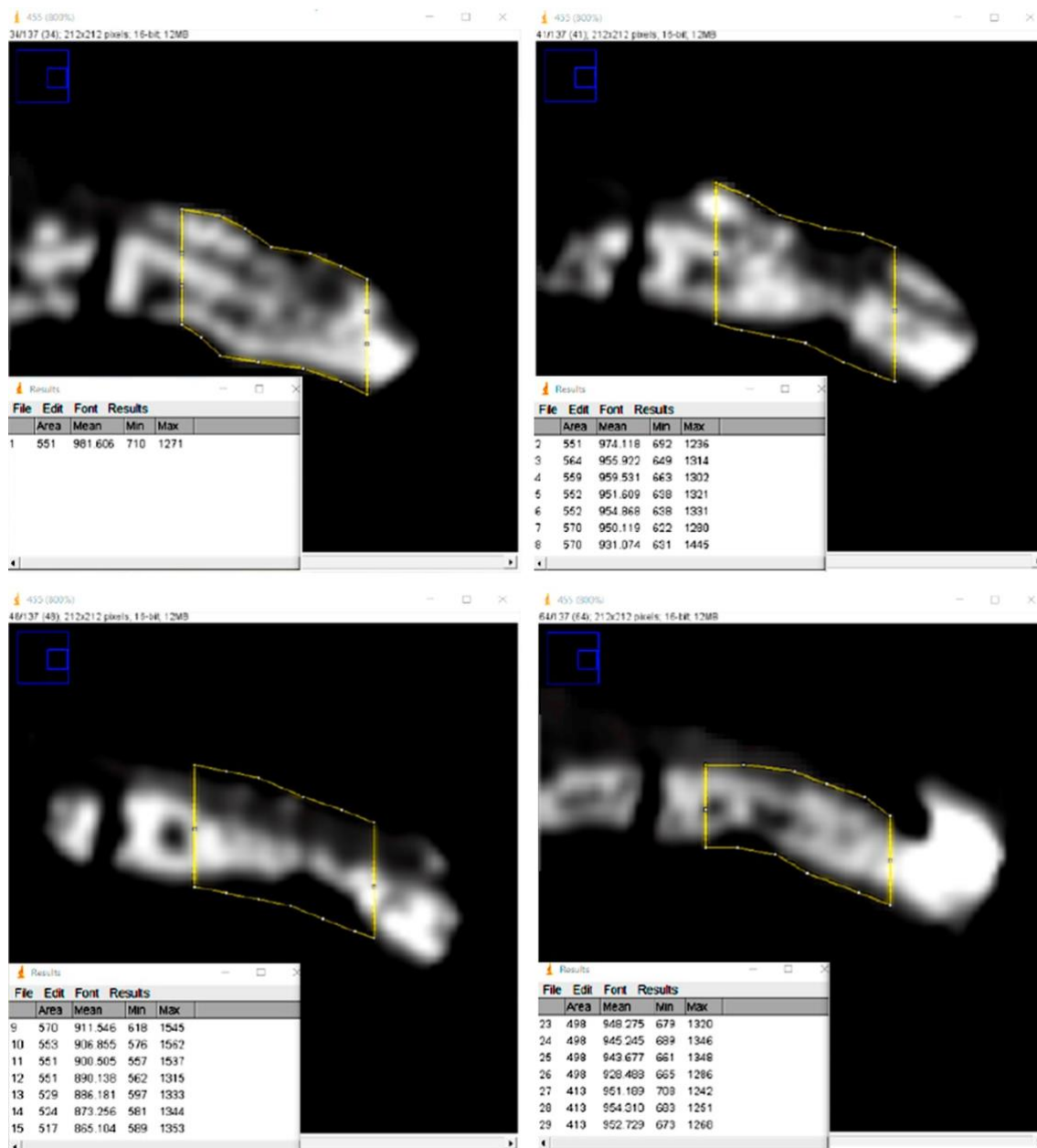


**Fig. 17.-** Muestra radiológica con las zonas de análisis, cuadrado marcado en negro en cada una de las muestras.

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

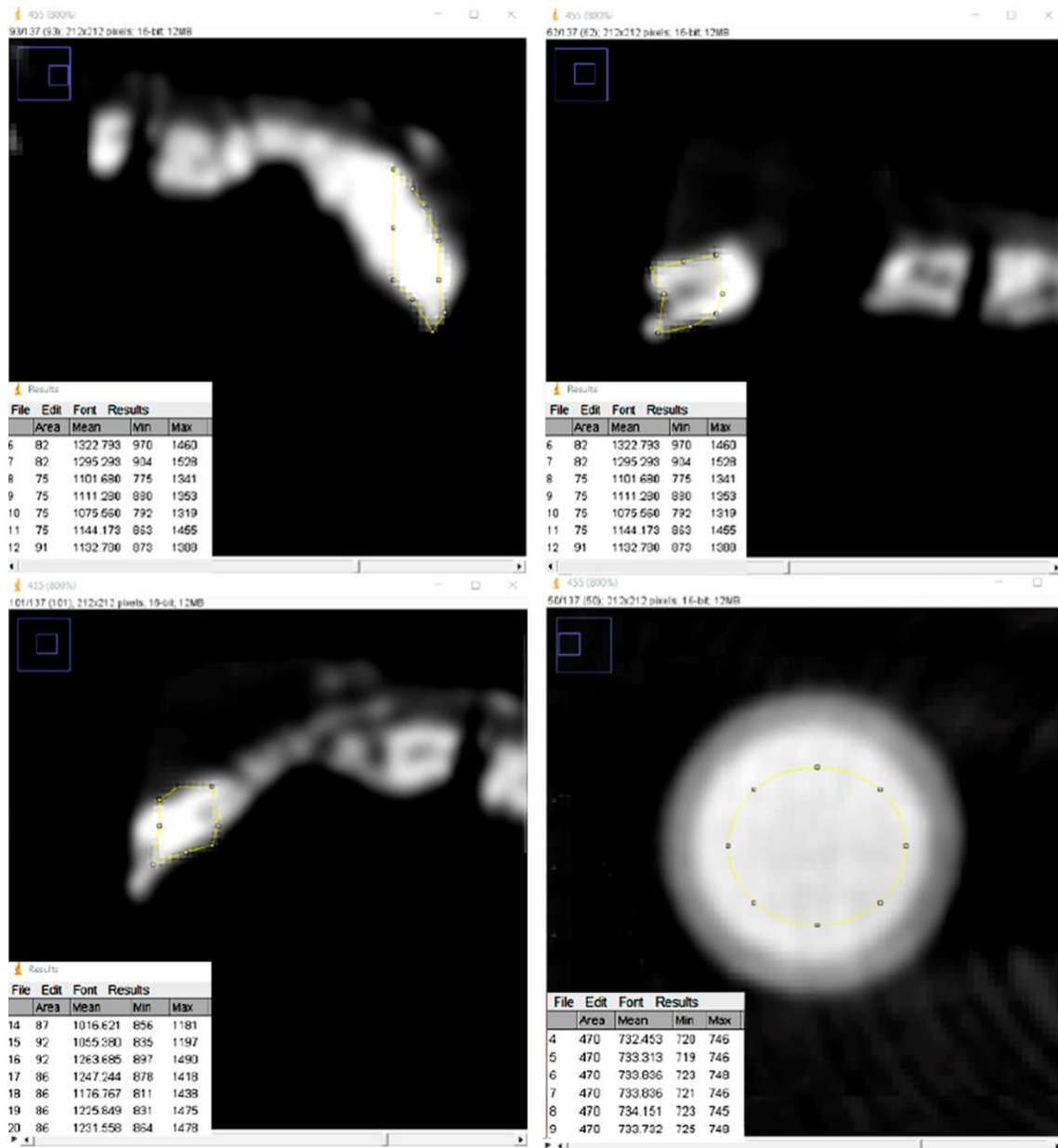
En cada uno de los 29 cortes, se definió el área del defecto de 29 vóxeles de largo por el ancho proyectado del espesor óseo, y se midió la densidad radiológica de esa zona con el programa ImageJ 1.48v para Java 1.6.0.20 (Oracle Corp., Redwood Shores, CA, Estados Unidos).





**Fig. 18.-** capturas de pantallas en el proceso de medición de la densidad radiográfica de la zona de estudio de la muestra 455.

También se tomaron 20 mediciones de la densidad radiológica de una zona no intervenida del hueso de la calota próximo al defecto, y 10 mediciones de la densidad radiológica a un patrón estándar (agua desmineralizada), a fin de estandarizar todas las muestras entre sí.



**Fig. 19.-** capturas de pantallas de las mediciones de densidades radiográficas de zonas no intervenidas y del agua (inferior derecha)

El agua destilada no representa un extremo de medición; se utilizó como patrón conocido para estandarizar la totalidad de las muestras, ya que al colocar un divisor conocido bajo cada medición se eliminan todas las variables ambientales.

Una vez obtenidas las 29 medidas de densidades radiológicas en cada muestra, se estableció el promedio y se lo dividió por el promedio del patrón estándar para esa muestra particular.

Del mismo modo, el promedio de densidad radiológica para el hueso no intervenido fue dividido por el promedio del patrón estándar para esa muestra específica.

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

**Para lograr objetivo B****Estudios Histomorfométricos**

Luego de realizados los estudios micro tomográficos de alta resolución, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de histotecnología del Área de Biología Oral, ABO, de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, donde las muestras fueron descalcificadas mediante una solución de EDTA al 5 molar e incluidas en bloques de parafina y se procedió a realizar cortes histológicos de 5 a 7 micrones de espesor mediante micrótopo. Los preparados fueron teñidos con Hematoxilina-eosina y fotografiados a 100 X con microscopio óptico. Se tomó para el estudio el mejor de los 3 cortes de cada muestra de la zona central del defecto.

En cada fotografía se identificó el hueso, el material del relleno y el tejido conjuntivo y mediante el software Image Pro Plus V452 se calculó el porcentaje de cada componente, lo que nos permitió evaluar la calidad de reparación ósea para cada muestra.

Por razones ajenos al tesista y debido a problemas del laboratorio ABO, se concluyó con la descalcificación en solución de EDTA y se derivó al laboratorio de histopatología de la Asociación de médicos patólogos y citopatólogos de Córdoba donde se realizaron los cortes y tinción de las muestras. (ANEXO 3)

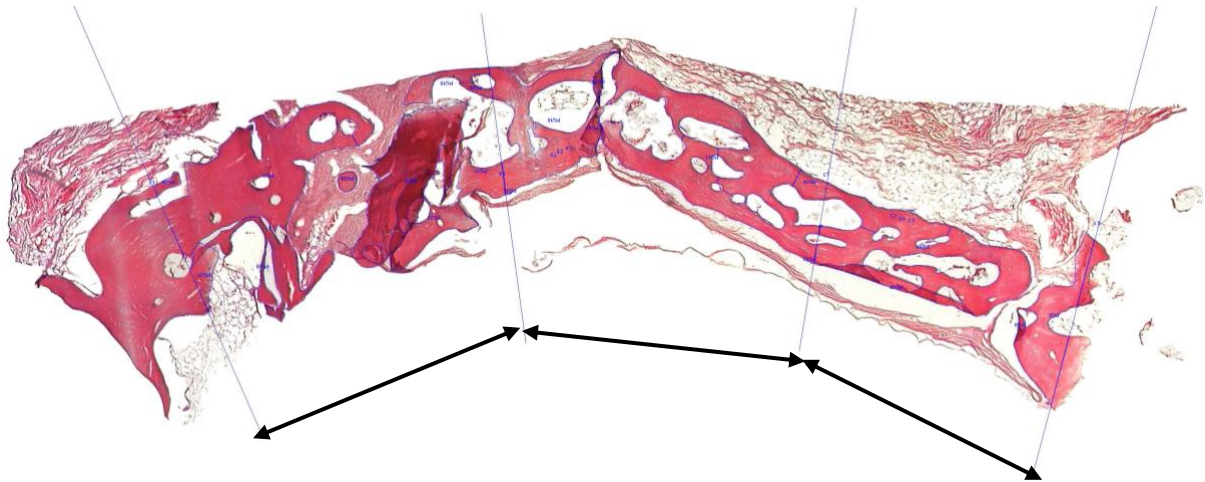
Estos inconvenientes que sufrieron las muestras hicieron que, en la mayoría de los preparados, se desprendieran las partículas de relleno óseo agregado (Bio-Oss) al ser cortadas, sin que la muestra sufriera desgarro, quedando los espacios vacíos donde se encontraban las partículas de relleno delimitado por el hueso nuevo formado alrededor. Lo que se corroboró observando los tacos de las muestras con lupa Olympus, Japón, magnificación 50X, pudiendo esto deberse al excesivo tiempo que pasaron las muestras en el fijador.

Las muestras teñidas con hematoxilina-eosina se ingresaron el laboratorio de micro fotografía de ABO donde se procedió a seleccionar un único corte de la serie de cada vidrio por observación directa en microscopio, evitando en lo posible plegamientos y otros artefactos, priorizando el plano de corte que represente mejor la zona de interés para el estudio. Eventualmente, cuando fue necesario se evaluaron dos cortes del mismo caso.

A partir las imágenes adquiridas con microscopio Olympus BX-50 con magnificación de 100X (un promedio de 70 imágenes por corte), se generó una única imagen completa para su posterior análisis histomorfométricos. La cual se obtuvo luego del proceso de armado con herramientas de Photoshop CS6 de Adobe, manteniendo la resolución original de las imágenes individuales.

Para las mediciones se utilizó el software Image Pro Plus v.4.52 de Media Cybernetics, con el cual se midió la totalidad del defecto generado de cada muestra, para lo cual, la zona del

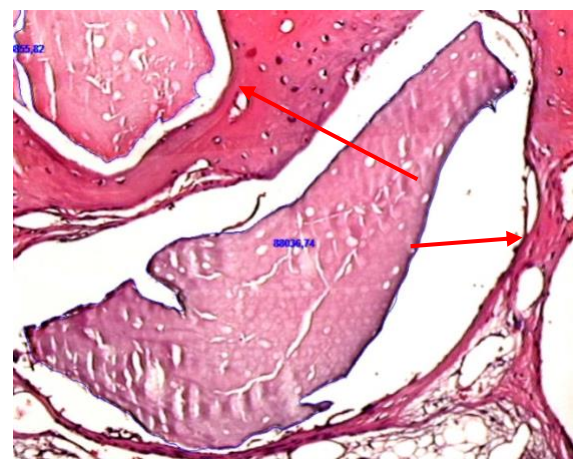
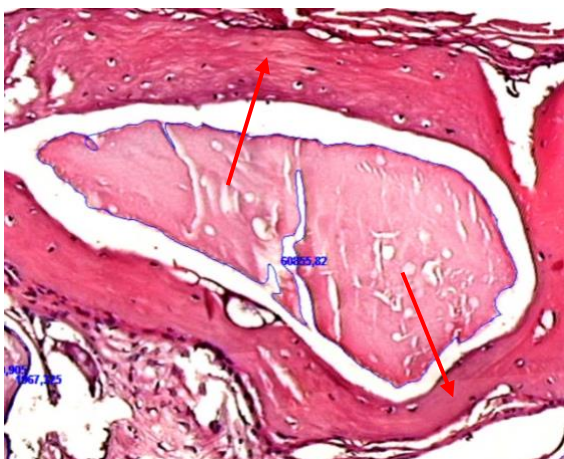
defecto de cada muestra, se la dividió digitalmente en 3 tercios, izquierdo, medio y derecho. Como se aprecia en la figura siguiente.



**Fig. 20.-** Muestra 359, 8 semanas, sin relleno agregado, se aprecia como los islotes de neo formación se fueron uniendo obliterando casi completamente el defecto, pero con un espesor menor al del hueso normal. Detalle de la partición digital de la muestra en 3 sectores. (Mag. 40X, Olympus BX-50).

La presente sectorización nos permite evaluar más acertadamente el proceso reparatorio, dado que la neo formación ósea se genera mayoritariamente, en los primeros estadios de curación, desde los bordes de la herida avanzando hacia el centro y luego aparecen los islotes de calcificación en la zona central. (Dinámica de cicatrización de la especie).

Mediante la herramienta zoom del programa, se aumentó el tamaño de cada zona, a fin de delimitar adecuadamente cada partícula de relleno, concluida esta tarea se procedió a delimitar las zonas de hueso nuevo de cada sector para luego, teniendo presente el tamaño total de la zona, calcular la cantidad de tejido blando existente.



**Figs. 21 y 22.-** Magnificación donde se aprecian partículas y hueso neo formado rodeando las partículas (flechas rojas). Cada partícula medida o área fueron expresadas en  $\mu\text{m}^2$  (Mag. 100X, Olympus BX-50).

**Análisis estadísticos**

Con el objeto de evaluar la influencia de los factores: tipo de membrana, presencia o no de material de relleno agregado y tiempo, sobre el porcentaje de mineralización registrado y la posible interacción entre ellos se realizó un análisis multifactorial ANOVA de 3 vías.

Para analizar los porcentajes de mineralización bajo cada membrana, se emplearon comparaciones múltiples con una variable dependiente mediante test DHS de Tukey.

Para todas las pruebas se fijó el nivel de significación estadística en 0,05.

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó del software SPSS v.19

# RESULTADOS

### Resultados microtomográficos

En cada muestra se promediaron los 29 cálculos promedios de cada una de las zonas de defectos, más los 20 cálculos de zonas no intervenidas, más las 10 tomas de agua, luego los 5 resultados (4 zonas intervenidas y zona no intervenida) se normalizaron dividiendo los valores obtenidos por el valor promedio del agua, con lo cual se eliminan todas las variables ambientales del estudio.

Se tomó el valor obtenido del hueso no intervenido como 100% de mineralización y por regla de 3 simple se obtuvo el valor de mineralización de cada muestra.

También se tomó el menor y mayor valor de mineralización de cada muestra a fin de poder establecer el rango de resultados.

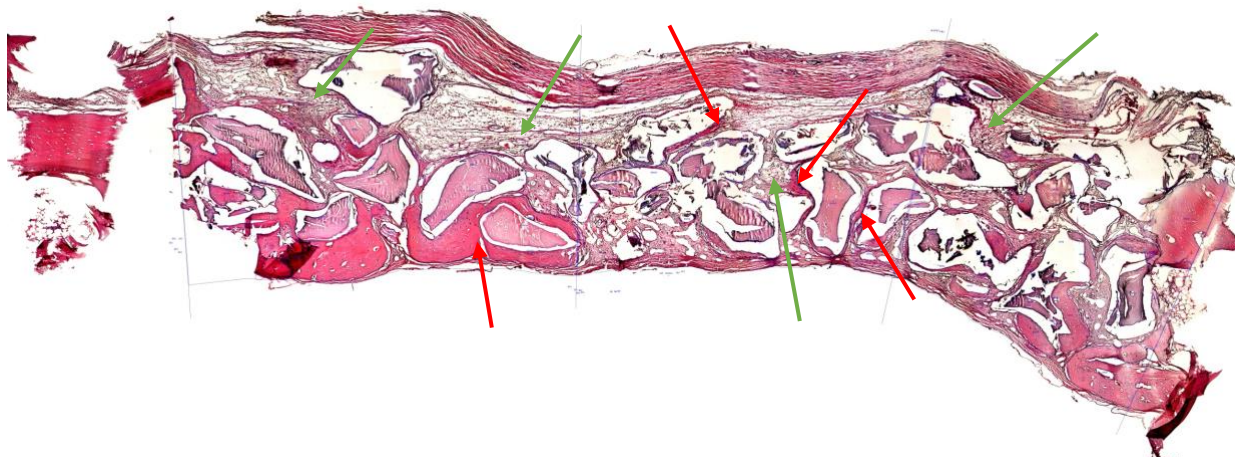
**Tabla 1:** Porcentaje de mineralización radiológica en ambos periodos de tiempo

Membrana	Análisis del % de mineralización a las 4 semanas según membrana			Análisis del % de mineralización a las 8 semanas según membrana		
	Espécimen	Zona 0 vacío	Zona 1 BioOss	Espécimen	Zona 0 vacío	Zona 1 BioOss
Fasia Lata	1B 878	68,6 ± 46%	91,8 ± 28%	11B 889	75,4 ± 22%	70,9 ± 25%
	2B 535	69,6 ± 29%	92,7 ± 22%	12B 866	78,8 ± 31%	90,5 ± 25%
	3A 652	65,9 ± 36%	89,0 ± 24%	13A 806	78,7 ± 29%	71,6 ± 33%
	4A 662	72,3 ± 38%	95,4 ± 26%	14 A 673	77,7 ± 27%	77,6 ± 27%
Amniocorio	3B 652	77,8 ± 48%	99,1 ± 27%	14B 673	68,6 ± 27%	91,8 ± 27%
	4B 662	73,2 ± 42%	107,3 ± 25%	16 A 93	71,9 ± 39%	87,7 ± 25%
	5A 71	40,8 ± 50%	60,3 ± 27%	15 A 360	63,5 ± 40%	83,1 ± 30%
	6A 182	57,2 ± 43%	79,6 ± 24%	13B 806	76,7 ± 42%	71,8 ± 34%
Sin membrana	7B 454	63,8 ± 39%	82,8 ± 23%	17B 189	55,5 ± 34%	46,7 ± 46%
	8B 455	62,1 ± 47%	76,9 ± 35%	18B 359	88,7 ± 28%	76,9 ± 27%
	9A 615	59,7 ± 42%	76,7 ± 28%	19A 633	68,9 ± 29%	58,6 ± 34%
	10 A 617	66,1 ± 44%	83,1 ± 30%	20A 642	75,3 ± 33%	65,0 ± 38%
Colágeno	1A 878	56,9 ± 32%	86,7 ± 29%	11 A 889	75,2 ± 30%	92,5 ± 22%
	2A 535	66,3 ± 39%	81,6 ± 24%	12A 866	71,0 ± 33%	76,0 ± 30%
	9B 615	58,4 ± 34%	80,9 ± 24%	19B 633	69,9 ± 30%	81,1 ± 25%
	10B 617	64,8 ± 39%	87,3 ± 24%	20B 642	76,3 ± 32%	87,5 ± 27%
Pericardio	5B 71	42,8 ± 52%	61,9 ± 33%	15B 360	72,6 ± 33%	74,4 ± 26%
	6B 182	37,1 ± 46%	78,5 ± 33%	17A 189	52,5 ± 38%	50,1 ± 43%
	7A 454	70,4 ± 47%	86,9 ± 24%	18A 359	87,8 ± 30%	75,0 ± 55%
	8A 455	65,3 ± 35%	83,4 ± 34%	16B 93	70,9 ± 33%	66,5 ± 41%

**Tabla 1.-** Se observa el grado promedio de mineralización y su variación entre la zona de mayor y menor mineralización de cada uno de los ejemplares estudiados



**Resultados histomorfométricos**



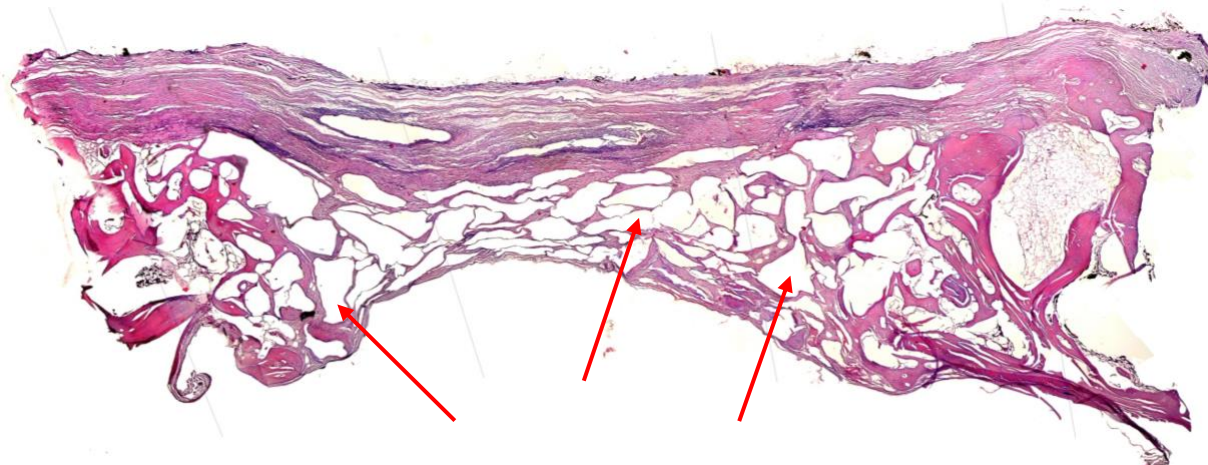
**Fig. 23.-** Muestra 454 (0), 4 semanas, con relleno agregado, se aprecian las partículas de relleno rodeadas por hueso nuevo (flechas rojas) y conjuntivo (flechas verdes). (Mag. 40X, Olympus BX-50)

**Tabla 2:** Datos obtenidos de la muestra 454 (0)

Ref 454 (0)	Área evaluada por sector						Izquierdo	Central	Derecho	Área total evaluada		
							2,47	1,70	2,54	6,71	mm <sup>2</sup>	
Superficie hueso NEO (x sector)			Sup Hueso NEOf	Sup. Relleno residual (x sector)			Sup. Relleno	Sup. Tejido conectivo (x sector)			Sup. Conectivo	
Izquierdo	Central	Derecho		Izquierdo	Central	Derecho		Izquierdo	Central	Derecho		
0,51	0,14	0,68	1,32	0,39	0,36	0,57	1,33	1,57	1,20	1,29	4,06	
20,5%	8,0%	26,8%	19,7%	15,8%	21,5%	22,5%	19,8%	63,7%	70,6%	50,7%	60,5%	
Tramo		Espesor	Tramo		Features	Measureme	Value	Tramo				
Espesor Calota	Izquierdo	1,38	mm	Izquierdo	L5	Length	1790	µm	Izquierdo	Area µm <sup>2</sup>	2466258	
	Central	0,95	mm	Central	L6	Length	1780	µm	Central	Area µm <sup>2</sup>	1697167	
	Derecho	1,23	mm	Derecho	L7	Length	2073	µm	Derecho	Area µm <sup>2</sup>	2543571	
Promedio		<b>1,19</b>	mm									
Neoformado												
SECTOR IZQUIERDO (áreas en µm <sup>2</sup> )			SECTOR CENTRAL (áreas en µm <sup>2</sup> )				SECTOR DERECHO (áreas en µm <sup>2</sup> )					
123798	13197	2847	9318	19462	9380	674	1258	43075	230993	2554		
45276	3738	7168	2844	3403	20906	1360	2075	36037	3200	32687		
23806	9954	3611	2927	7650	2075	3625	2400	112215	42402	51421		
20221	154094	4242	1225	2786	2022	2651		9101	22263	1521		
14655	5297	9598	3875	9127	11883	2395		7022	41915	16691		
9018	3560	1205	410	8465	2952	4418		2284	6843	4044		
18810	572	7385	2891	6921	5680	1589		5657	3973	7005		
			<b>505542</b>					<b>135155</b>				
Partículas												
SECTOR IZQUIERDO (áreas en µm <sup>2</sup> )			SECTOR CENTRAL (áreas en µm <sup>2</sup> )				SECTOR DERECHO (áreas en µm <sup>2</sup> )					
4118	2161	483	3688	1113	3392	4457	22352	7712	11749	3198	80083,3	
45402	2912	9162	44968	4336	54630	730	5393	41823	15688	3526		
30528	8188	23489	10719	22332	21389	1812	1287	5362	21414	3422		
2219	2386	2746	186443	5213	4914	2005	2650	77201	88207	5881		
1464	2164	225		8371	1322	2971	51765	18137	4270	2684		
3496	2961	488		1392	6025	33219	101375	104708	62265	14146,18		
			<b>390409</b>					<b>364444</b>				

**Tabla 2.-** datos obtenidos de la muestra 454(0), con agregado de injerto óseo, con cobertura de membrana de pericardio porcino y en primer periodo de tiempo, 4 semanas



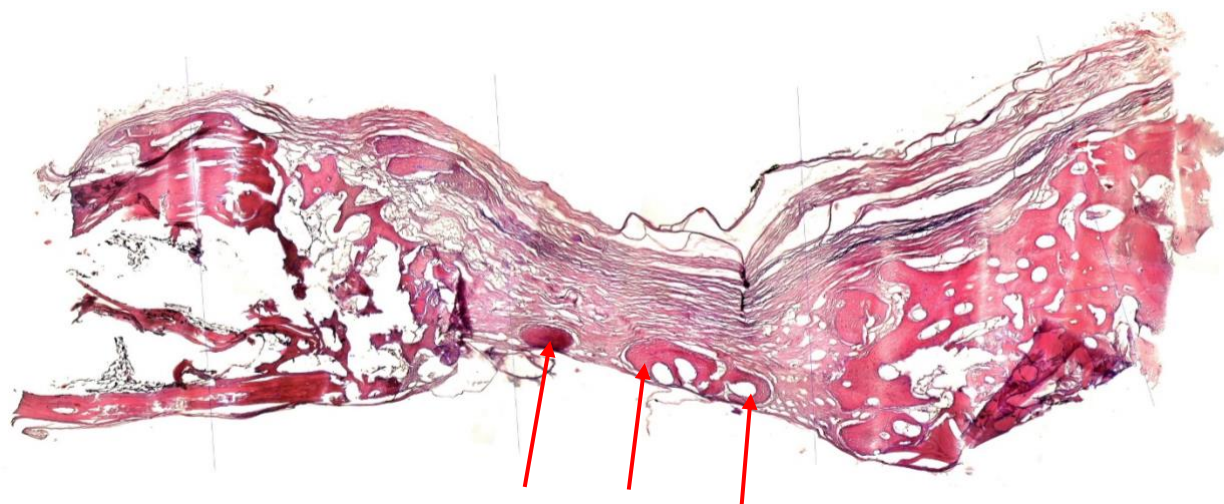


**Fig. 25.-** Muestra 182 (0), 4 semanas, con relleno agregado, se aprecia claramente los lugares donde estuvo alojado el relleno (flechas rojas), rodeados por hueso neo formado y conjuntivo que conserva la forma. (Mag. 40X, Olympus BX-50)

**Tabla 4.-** Datos obtenidos de la muestra 182 (0)

Ref	Área evaluada por sector						Izquierdo	Central	Derecho	Área total evaluada		
	182 (0)									2,69	2,21	3,67
Superficie hueso NEO (x sector)			Sup Hueso NEOf	Sup. Relleno residual (x sector)			Sup. Relleno	Sup. Tejido conectivo (x sector)			Sup. Conectivo	
Izquierdo	Central	Derecho		Izquierdo	Central	Derecho		Izquierdo	Central	Derecho		
0,64	0,06	1,18	1,88	0,82	1,06	0,67	2,55	1,23	1,09	1,82	4,14	
23,8%	2,7%	32,2%	22,0%	30,6%	47,9%	18,2%	29,7%	45,7%	49,4%	49,6%	48,3%	
Tramo		Espesor	Tramo		Features	Measureme	Value	Tramo				
Espesor Calota	Izquierdo	1,35	mm	Izquierdo	L5	Length	1993	µm	Izquierdo	Area µm <sup>2</sup>	2687718	
	Central	1,03	mm	Central	L6	Length	2140	µm	Central	Area µm <sup>2</sup>	2209758,5	
	Derecho	1,87	mm	Derecho	L7	Length	1963	µm	Derecho	Area µm <sup>2</sup>	3668383	
Promedio		1,41	mm									
Neoformado												
SECTOR IZQUIERDO (áreas en µm <sup>2</sup> )			SECTOR CENTRAL (áreas en µm <sup>2</sup> )				SECTOR DERECHO (áreas en µm <sup>2</sup> )					
64973,8	51722,7	24854,9	4363	1387	6289	59528	21768	12775	73313,96			
38445,3	4056,0	111109,0	13537	1721	1099	17870	103749	1590	112438,5			
11012,2	90873,4	10410,2	7217	5186		10343	157995	1198	20161,15			
4078,7	11408,0	1958,3	3658	1554		11622	120633	1963	2796,827			
1059,8	14491,0	11341,1	2619	8184		2743	71700	60639	87357,39			
55997,2	12427,8	686,1	3176			38960	8404	7087	62083			
118027,3						327	98838	13480				
			638933					59990				
Partículas												
SECTOR IZQUIERDO (áreas en µm <sup>2</sup> )			SECTOR CENTRAL (áreas en µm <sup>2</sup> )				SECTOR DERECHO (áreas en µm <sup>2</sup> )					
49318	44846		115379	138733		47866	51378	22637				
235192	76669		34922	201966		13032	95691	25512				
68821	92715		219814			73965	92803	22292				
48745	82526		286249			54262	37617					
54129			62024			54627	38841					
68493						36282						
			821454					1059087				

**Tabla 4.-** Datos obtenidos de la muestra 182(0), con agregado de injerto óseo, con cobertura de membrana amnio coriónica humana y en primer periodo de tiempo, 4 semanas.



**Fig. 26.-** Muestra 182 (1), 4 semanas, sin relleno agregado, se aprecian los islotes de neoformación ósea en la zona central del defecto (flechas rojas), y el mayor crecimiento desde los bordes. (Mag. 40X, Olympus BX-50)

**Tabla 5:** Datos obtenidos de la muestra 182 (1).

Ref 182 (1)	Área evaluada por sector						Izquierdo 2,47	Central 0,95	Derecho 2,39	Área total evaluada		
										5,81	mm <sup>2</sup>	
Superficie hueso NEO (x sector)			Sup Hueso NEOf	Sup. Relleno residual (x sector)			Sup. Relleno	Sup. Tejido conectivo (x sector)			Sup. Conectivo	
Izquierdo	Central	Derecho		Izquierdo	Central	Derecho		Izquierdo	Central	Derecho		
0,83	0,15	1,30	2,28	0,01	0,00	0,00	0,01	1,63	0,80	1,09	3,52	
33,6%	15,6%	54,5%	39,3%	0,4%	0,0%	0,1%	0,2%	66,0%	84,4%	45,4%	60,5%	
Tramo		Espesor		Tramo	Features	Measureme	Value		Tramo			
Espesor Calota	Izquierdo	1,50	mm	Izquierdo	L5	Length	1644	µm	Izquierdo	Area µm <sup>2</sup>	2470054	
	Central	0,56	mm	Central	L6	Length	1700	µm	Central	Area µm <sup>2</sup>	947739,5	
	Derecho	1,43	mm	Derecho	L7	Length	1668	µm	Derecho	Area µm <sup>2</sup>	2391619	
Promedio		1,16	mm									
Neoformado												
SECTOR IZQUIERDO (áreas en µm <sup>2</sup> )			SECTOR CENTRAL (áreas en µm <sup>2</sup> )				SECTOR DERECHO (áreas en µm <sup>2</sup> )					
103662	3976	30024	113223	1232				7952	6577	915		
14966	961	65345	29611	31286				148991	47513	577		
50639	86835	10263	15742	113627				12484	68271	6380		
40571	4931	9577	24467	1503				57202	44100	26848		
20	90556	23255						152225	216944	44313		
30590	57036	23028						181086	3246	3260		
								273246	1825			
			829278					147647				
Partículas												
SECTOR IZQUIERDO (áreas en µm <sup>2</sup> )			SECTOR CENTRAL (áreas en µm <sup>2</sup> )				SECTOR DERECHO (áreas en µm <sup>2</sup> )					
10254								1749				
			10254					0				
											1749	

**Tabla 5.-** Datos obtenidos de la muestra 182(1), sin agregado de injerto óseo, con cobertura de membrana amnio coriónica humana y en primer periodo de tiempo, 4 semanas.

Tabla 6 a: Compilado general de datos de todas las muestras a las 4 semanas

Table with columns: Relleno, Membrana, Ref caso, Dens. Rad., Sup. NEOFORMADA (Area mm², Sup./mm), Sup. INIERTO (Area mm², Sup./mm), Sup. CONECTIVO (Area mm², Sup./mm), Extensión sector (mm), HUESO, TOTALES (mm²) (RELL., H+R, CONECT.), ESPESOR (Zona central, Zona Peri.). Rows include sample IDs (e.g., 071(3), 091(1), 182(0)) and various measurements.

Tabla 6a.- Contiene los datos de todos los casos correspondiente a 4 semanas, con o sin relleno, tipo de cobertura, densidad radiográfica relativa, superficies por milímetro lineal y por milímetro cuadrado diferenciados por tipo de tejido y localización dentro de la muestra, general del tejido y sumatoria de hueso neo formado más injerto agregado.

Tabla 6 b: Compilado general de datos de todas las muestras a las 8 semanas

Table with columns: Relleno, Membrana, Sup. NEOFORMADA, Sup. INJERTO, Sup. CONECTIVO, Extensión sector (mm), HUESO, RELL., H+R, CONECT., ESPOSOR. Rows include data for cases 089(1) through 642(0).

Tabla 6b.- Contiene los datos de todos los casos correspondiente a 8 semanas, con o sin relleno, tipo de cobertura, densidad radiográfica relativa, superficies por milímetro lineal y por milímetro cuadrado diferenciados por tipo de tejido y localización dentro de la muestra, general del tejido y sumatoria de hueso neo formado más injerto agregado.

**Tabla 7:** Resumen de datos a las 4 semanas

TIEMPO: 4 semanas									
Relleno	Membrana	Ref. caso	Densidad radiográfica	HUESO	RELLENO	CONECTIVO	H+R	Espesor central	Espesor periferico
Bio-Oss	Amniocoriónica	071 (3)	60,31	0,18	0,33	0,89	0,51	1,31	1,44
		091 (1)	99,00	0,46	0,24	0,49	0,69	1,25	1,14
		182 (0)	79,57	0,31	0,42	0,68	0,73	1,04	1,61
		222 (1)	107,25	0,45	0,66	0,75	1,10	1,80	1,89
	Colageno	553 (0)	82,00	0,75	0,26	1,10	1,01	1,99	2,17
		674 (1)	80,94	0,50	0,38	1,06	0,88	1,69	2,07
		683 (1)	87,34	0,51	0,60	1,05	1,12	2,08	2,21
		878 (1)	87,00	0,54	0,49	0,93	1,03	1,84	2,02
	Fascia lata	652 (1)	89,00	0,39	0,38	0,92	0,77	1,61	1,72
		662 (1)	95,40	0,45	0,49	0,76	0,95	1,67	1,73
		877 (1)	93,00	0,42	0,31	0,93	0,73	1,42	1,79
		900 (1)	83,00	0,19	0,60	0,63	0,78	1,40	1,41
	Pericardio	071 (0)	61,96	0,14	0,52	0,70	0,65	1,21	1,45
		182 (3)	78,54	0,24	0,07	0,59	0,32	0,56	1,10
		454 (0)	82,81	0,24	0,24	0,64	0,48	0,95	1,20
		455 (2)	76,92	0,35	0,41	1,08	0,76	1,79	1,86
	Sin membrana	615 (1)	76,66	0,33	0,41	0,93	0,75	1,44	1,80
		617 (1)	83,06	0,25	0,39	0,99	0,65	1,60	1,66
		454 (3)	86,94	0,29	0,60	1,13	0,89	2,01	2,03
		455 (1)	83,44	0,35	0,26	0,67	0,61	1,18	1,33
S/relleno	Amniocoriónica	071 (2)	40,81	0,11	0,00	1,14	0,11	1,04	1,35
		091 (0)	78,00	0,38	0,00	0,46	0,38	0,68	0,92
		182 (1)	57,23	0,46	0,00	0,70	0,46	0,56	1,47
		222 (0)	73,00	0,46	0,00	0,63	0,46	0,90	1,19
	Colageno	553 (1)	66,00	0,76	0,00	1,21	0,76	1,83	2,04
		674 (0)	58,44	0,61	0,00	1,15	0,61	1,49	1,89
		683 (0)	87,34	0,69	0,00	1,18	0,69	1,51	2,05
		878 (0)	57,00	0,74	0,00	1,28	0,74	1,90	2,09
	Fascia lata	652 (0)	65,90	0,40	0,00	0,61	0,40	0,55	1,22
		662 (0)	72,30	0,48	0,00	0,61	0,48	0,63	1,34
		877 (0)	70,00	0,53	0,00	0,69	0,53	1,10	1,29
		900 (0)	57,00	0,31	0,00	0,57	0,31	0,41	1,12
	Pericardio	071 (1)	42,82	0,09	0,00	0,40	0,09	0,30	0,57
		182 (2)	37,07	0,09	0,00	0,32	0,09	0,41	0,42
		454 (1)	63,75	0,35	0,00	0,56	0,35	0,09	1,25
		455 (0)	62,06	0,14	0,00	1,63	0,14	1,89	1,72
	Sin membrana	615 (0)	59,70	0,31	0,00	0,56	0,31	0,59	1,00
		617 (0)	66,10	0,40	0,00	0,83	0,40	1,21	1,25
		454 (2)	70,42	0,13	0,00	0,35	0,13	0,24	0,58
		455 (3)	65,26	0,42	0,00	1,55	0,42	1,50	2,23

**Tabla 7.-** Resumen de datos primer periodo de tiempo, 4 semanas, tipo de membrana de cobertura, densidad radiográfica relativa, cantidad de tejido, cantidad de hueso más injerto agregado remanente, espesor en mm del corte histológico en zona central y periférica.

**Tabla 8:** Resumen de datos a las 8 semanas

TIEMPO: 8 semanas									
Relleno	Membrana	Ref. caso	Densidad radiográfica	HUESO	RELLENO	CONECTIVO	H+R	Espesor central	Espesor periferico
Bio-Oss	Amniocoriónica	089 (1)	94,00	0,60	0,22	1,06	0,81	2,04	1,78
		090 (1)	92,00	0,34	0,16	0,99	0,50	1,51	1,48
		093 (1)	88,00	0,40	0,29	0,76	0,69	1,24	1,55
		806 (3)	76,68	0,26	0,40	1,18	0,65	1,55	1,98
	Colageno	651 (1)	81,08	0,54	0,30	0,96	0,83	1,41	1,98
		693 (1)	87,48	0,66	0,25	1,01	0,91	1,76	2,00
		866 (1)	76,00	0,70	0,18	1,19	0,88	2,02	2,10
		889 (1)	93,00	0,61	0,21	0,84	0,81	1,17	1,89
	Fascia lata	673 (1)	77,67	0,40	0,30	0,92	0,69	1,40	1,74
		806 (0)	78,73	0,51	0,34	1,06	0,84	1,55	2,08
		865 (1)	90,00	0,30	0,45	0,62	0,76	1,39	1,37
		879 (1)	71,00	0,36	0,36	0,80	0,72	1,43	1,56
	Pericardio	189 (1)	52,50	0,26	0,26	0,74	0,53	1,17	1,32
		359 (0)	87,75	0,35	0,22	0,96	0,57	1,67	1,45
		360 (3)	74,38	0,31	0,32	0,67	0,63	1,17	1,36
		623 (1)	66,50	0,28	0,28	0,79	0,56	1,29	1,39
	Sin membrana	189 (3)	55,45	0,24	0,22	0,73	0,46	1,19	1,18
		359 (3)	88,70	0,32	0,41	0,66	0,73	1,31	1,43
		633 (1)	58,61	0,21	0,26	0,59	0,48	0,91	1,14
		642 (1)	65,01	0,25	0,21	0,59	0,46	0,83	1,17
S/relleno	Amniocoriónica	089 (0)	82,00	0,85	0,00	0,54	0,85	1,30	1,44
		090 (0)	69,00	0,41	0,00	0,40	0,41	0,99	0,72
		093 (0)	74,00	0,72	0,00	0,67	0,72	1,32	1,42
		806 (2)	71,75	0,45	0,00	0,53	0,45	0,45	1,27
	Colageno	651 (0)	69,87	0,65	0,00	1,42	0,65	1,90	2,15
		693 (0)	76,27	0,73	0,00	1,19	0,73	1,53	2,12
		866 (0)	71,00	0,66	0,00	1,27	0,66	1,80	1,99
		889 (0)	75,00	0,38	0,00	1,29	0,38	1,62	1,70
	Fascia lata	673 (0)	77,65	0,53	0,00	0,92	0,54	1,15	1,62
		806 (1)	71,64	0,62	0,01	1,38	0,63	1,77	2,14
		865 (0)	79,00	0,87	0,00	0,93	0,87	1,89	1,74
		879 (0)	75,00	0,65	0,01	1,11	0,66	1,64	1,83
	Pericardio	189 (0)	50,12	0,47	0,00	0,65	0,47	0,88	1,23
		359 (1)	75,01	0,75	0,00	1,05	0,75	1,65	1,89
		360 (2)	72,59	0,44	0,00	0,67	0,44	0,90	1,22
		623 (0)	70,94	0,47	0,00	0,72	0,47	0,87	1,34
	Sin membrana	189 (2)	46,68	0,30	0,00	0,34	0,30	0,59	0,67
		359 (2)	76,94	0,48	0,00	0,39	0,48	0,74	0,93
		633 (0)	58,87	0,35	0,00	0,50	0,35	0,70	0,94
		642 (0)	75,27	0,43	0,00	0,54	0,43	0,90	1,00

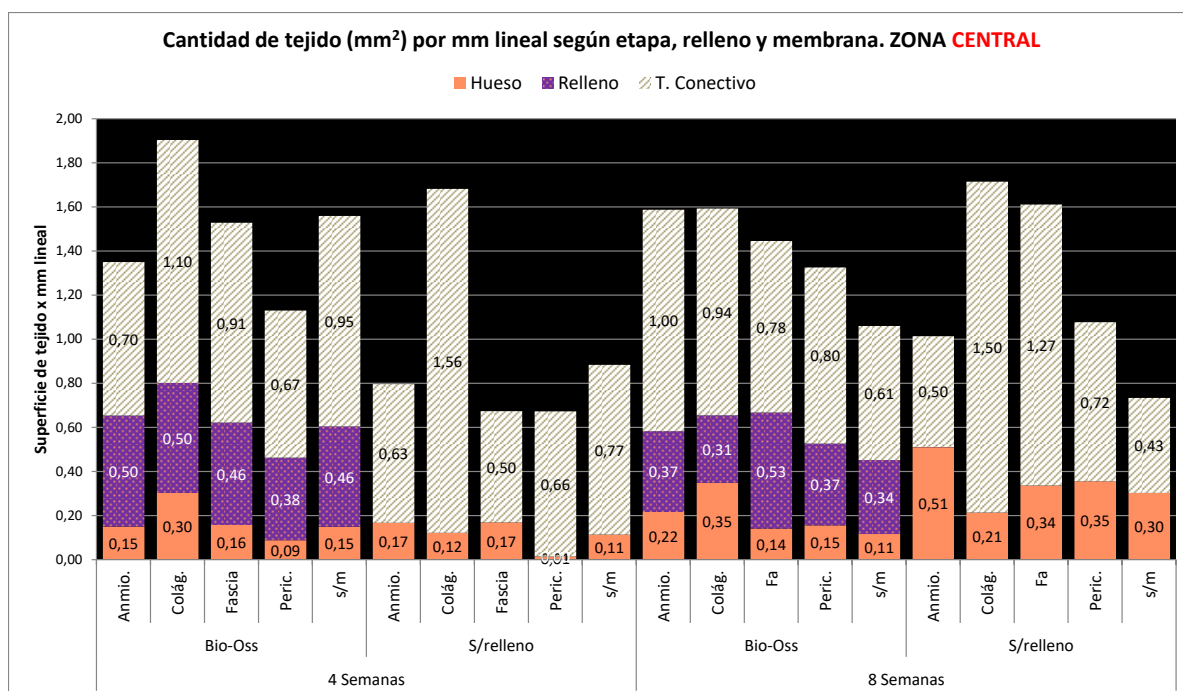
**Tabla 8.-** Resumen de datos primer periodo de tiempo, 8 semanas, tipo de membrana de cobertura, densidad radiográfica relativa, cantidad de tejido, cantidad de hueso más injerto agregado remanente, espesor en mm del corte histológico en zona central y periférica.



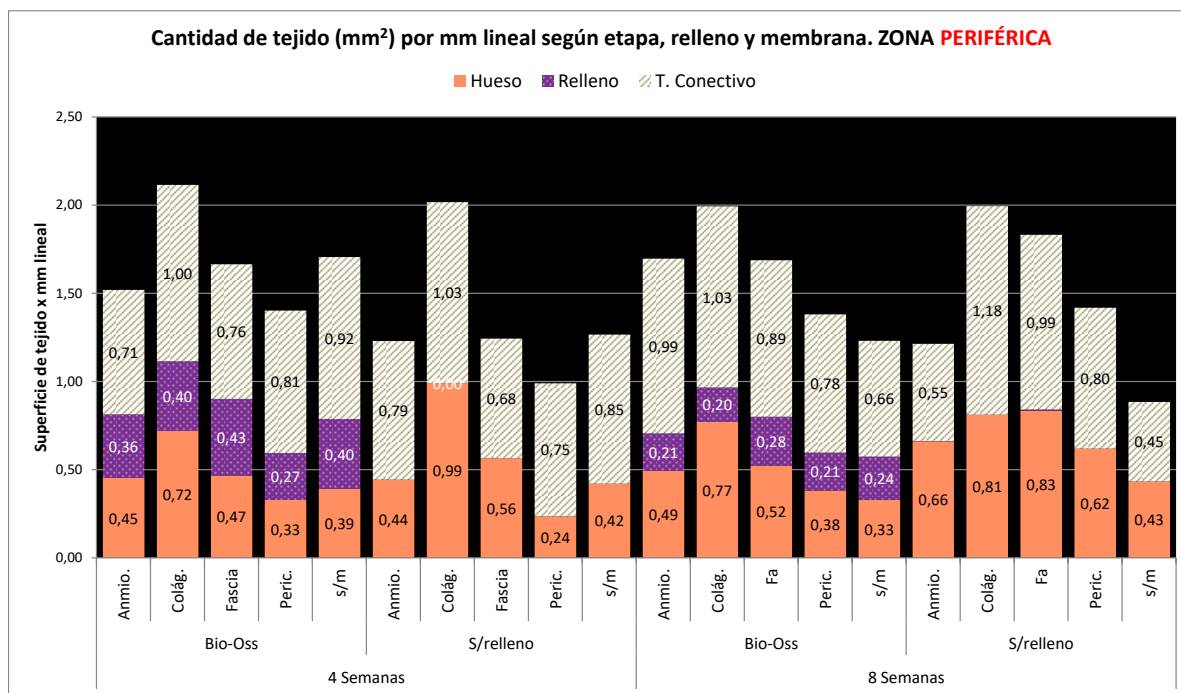
**Tabla 9:** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal

Tiempo	Relleno	Membrana	SUP NEO /mm horizontal		SUP INJERTO /mm horizontal		SUP CONECTIVO / mm horizontal	
			Central	Perif.	Central	Perif.	Central	Perif.
			4 Semanas	Bio-Oss	Anmio.	0,15	0,45	0,50
Colág.	0,30	0,72			0,50	0,40	1,10	1,00
Fascia	0,16	0,47			0,46	0,43	0,91	0,76
Peric.	0,09	0,33			0,38	0,27	0,67	0,81
s/m	0,15	0,39			0,46	0,40	0,95	0,92
S/relleno	Anmio.	0,17		0,44	0,00	0,00	0,63	0,79
	Colág.	0,12		0,99	0,00	0,00	1,56	1,03
	Fascia	0,17		0,56	0,00	0,00	0,50	0,68
	Peric.	0,01		0,24	0,00	0,00	0,66	0,75
	s/m	0,11		0,42	0,00	0,00	0,77	0,85
8 Semanas	Bio-Oss	Anmio.	0,22	0,49	0,37	0,21	1,00	0,99
		Colág.	0,35	0,77	0,31	0,20	0,94	1,03
		Fa	0,14	0,52	0,53	0,28	0,78	0,89
		Peric.	0,15	0,38	0,37	0,21	0,80	0,78
		s/m	0,11	0,33	0,34	0,24	0,61	0,66
	S/relleno	Anmio.	0,51	0,66	0,00	0,00	0,50	0,55
		Colág.	0,21	0,81	0,00	0,00	1,50	1,18
		Fa	0,34	0,83	0,00	0,01	1,27	0,99
		Peric.	0,35	0,62	0,00	0,00	0,72	0,80
		s/m	0,30	0,43	0,00	0,00	0,43	0,45

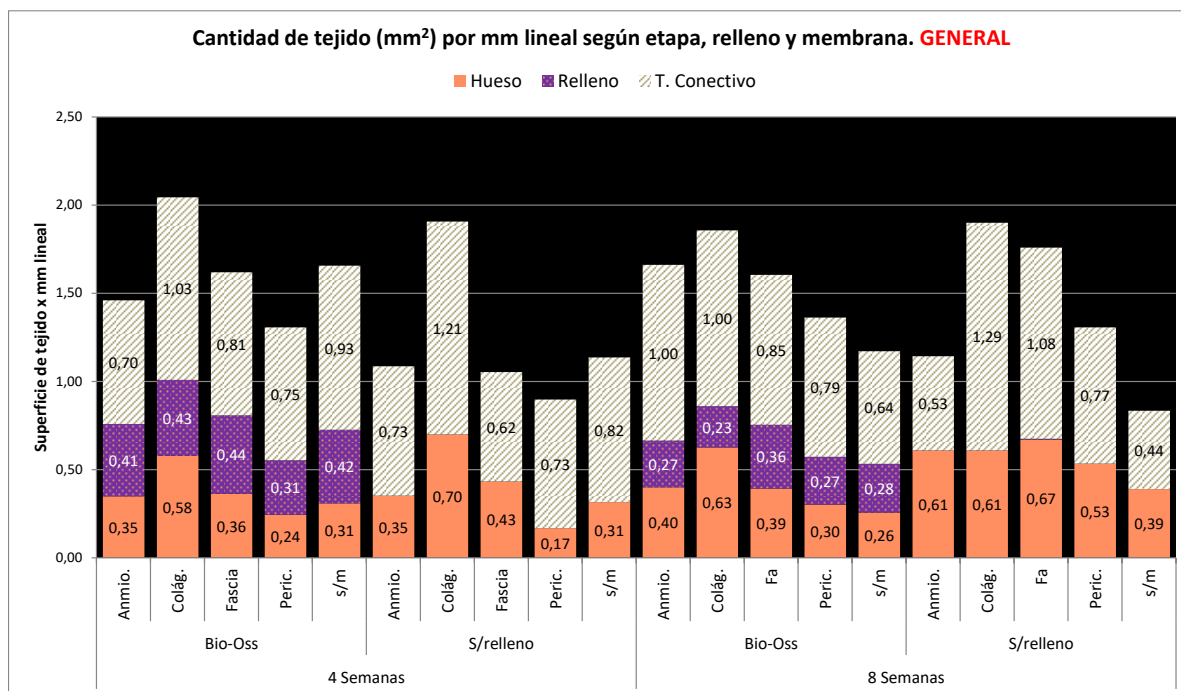
**Tabla 9.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapa, relleno y membrana. El término “Cantidad de tejido por milímetro lineal o milímetro horizontal” es la unidad de medida que utilizamos para estandarizar las muestras, dado que las muestras tenían diferentes largos, en la zona a medir, (entre 5 y 6 mm lineales), al dividir la cantidad de tejido encontrado por el largo de la muestra obtenemos el coeficiente mm<sup>2</sup>/mm que nos permite comparar entre muestras.



**Fig. 27.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapa, relleno y membrana registrado en la zona central del defecto. Se destaca la menor cantidad de hueso neo formado en la zona central del preparado a las 4 semanas comparado con la zona periférica en el mismo lapso de tiempo (Fig. 28).



**Fig. 28.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapa, relleno y membrana registrado en la zona periférica del defecto. Resulta evidente la mayor reparación (cantidad de hueso nuevo) en las zonas periféricas comparado con las zonas centrales de los defectos (Fig. 27).

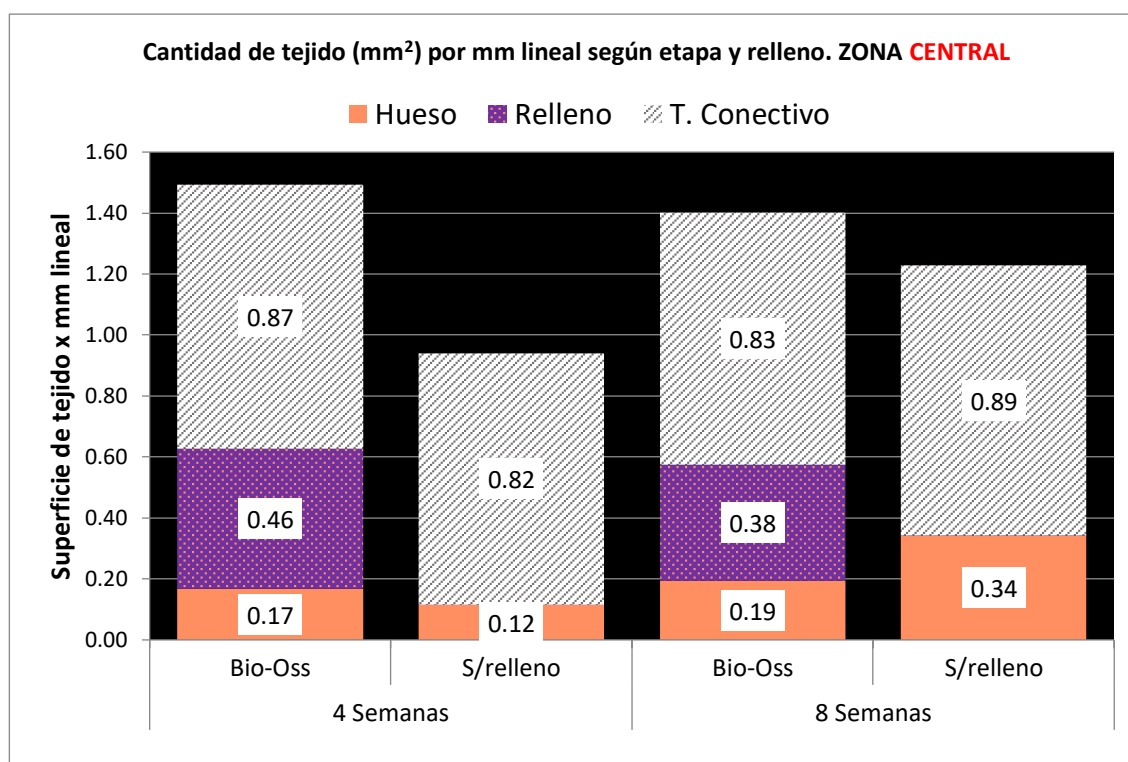


**Fig. 29.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapa, relleno y membrana registrado en todo el defecto. Si bien la sumatoria de hueso neo formado más injerto es superior en cada uno de los casos, según membrana y tiempo, lo que da mayor radio opacidad, y una mejor estructura tridimensional de la reparación, la cantidad total de hueso neo formado es mayor en la mayoría de los casos que no recibieron injertos.

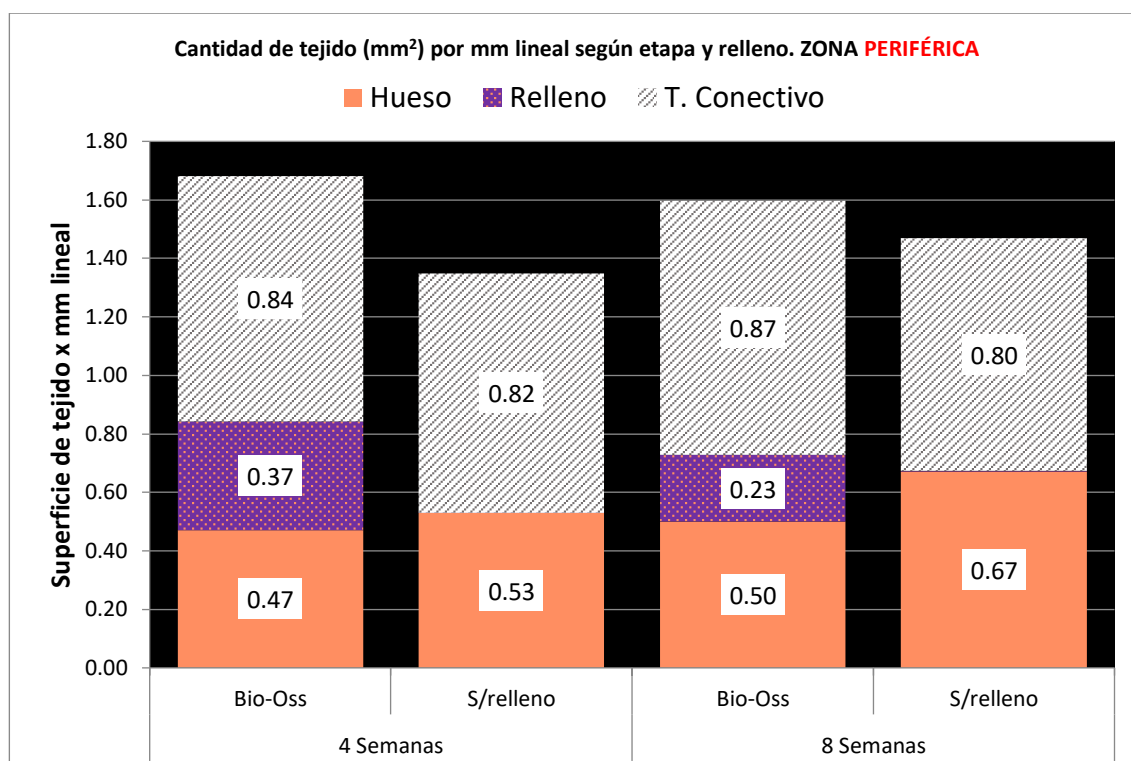
**Tabla 10:** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapa y relleno

Tiempo	Relleno	SUP NEO /mm horizontal		SUP INJERTO /mm horizontal		SUP CONECTIVO / mm horizontal	
		Central	Perif.	Central	Perif.	Central	Perif.
4 Semanas	Bio-Oss	0,17	0,47	0,46	0,37	0,87	0,84
	S/relleno	0,12	0,53	0,00	0,00	0,82	0,82
8 Semanas	Bio-Oss	0,19	0,50	0,38	0,23	0,83	0,87
	S/relleno	0,34	0,67	0,00	0,00	0,89	0,80

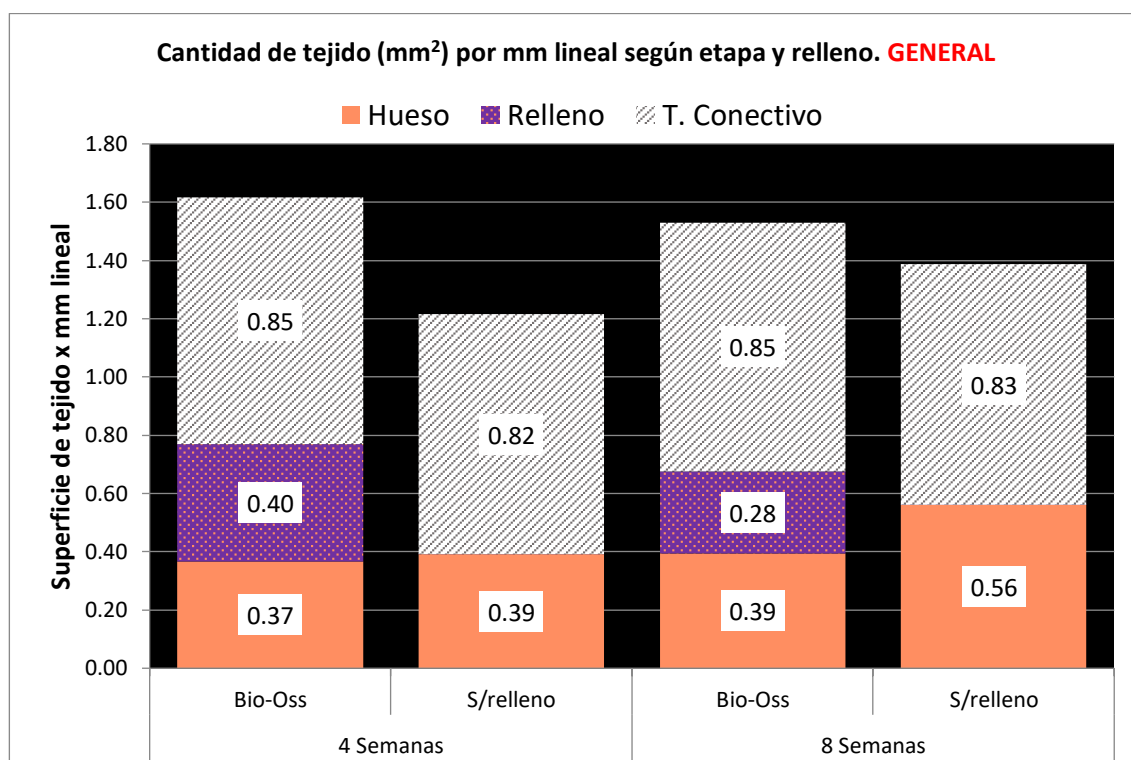
**Tabla 10.-** Agrupado de casos con y sin relleno sin diferenciación de membrana. Se destaca la mejor reparación tridimensional de la muestra en los casos con relleno, por la falta de colapso de la membrana explicitada en el espesor central de las muestras comparadas con los espesores periféricos.



**Fig. 30.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapas y relleno correspondientes a la zona central del defecto. La cantidad de hueso neo formado resulta menor frente a la ausencia de injerto en el primer estadio de tiempo, pero conforme va cicatrizando supera ampliamente a los defectos con injerto.



**Fig. 31.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapas y relleno correspondientes a la zona periférica del defecto. Se observa mayor formación de hueso nuevo en los casos sin injerto agregado en ambos periodos de tiempo, dado que en la periferia del defecto no hay colapso de la herida y el injerto interferiría con la cicatrización normal.

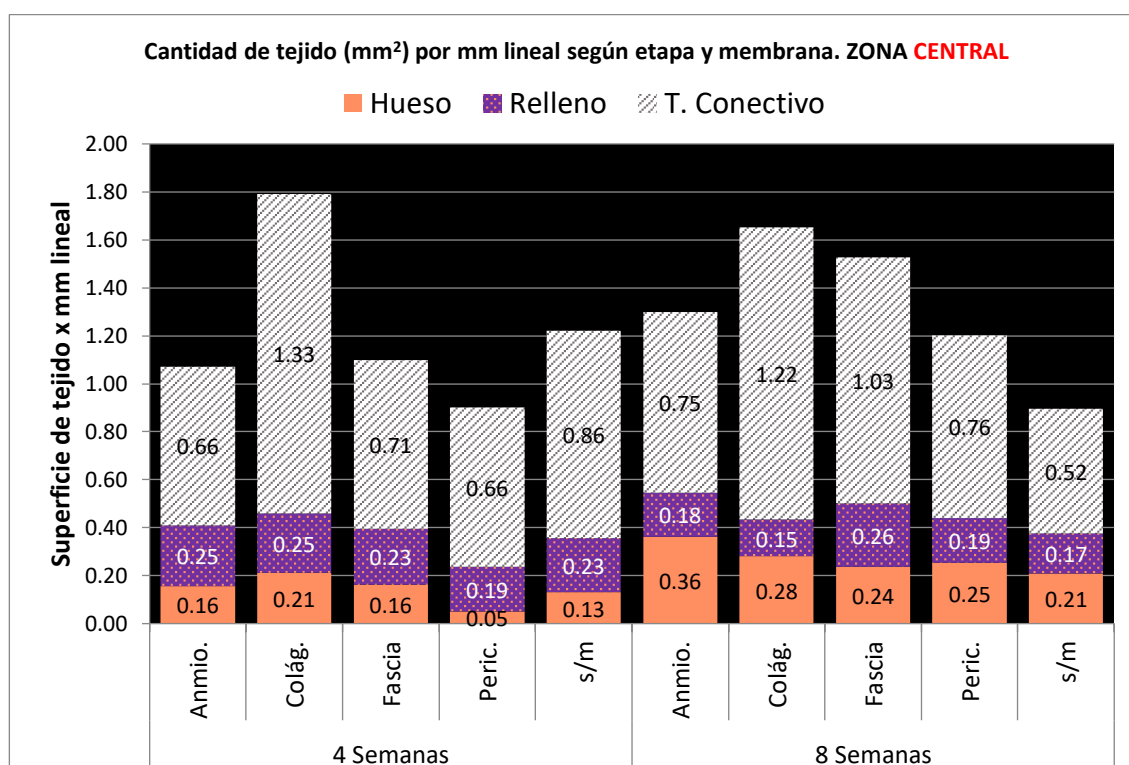


**Fig. 32.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapas y relleno correspondientes a todo el defecto. Encontramos mayor cantidad de hueso nuevo en los casos sin agregado de injerto al compararlos con los que sí tienen injerto agregado.

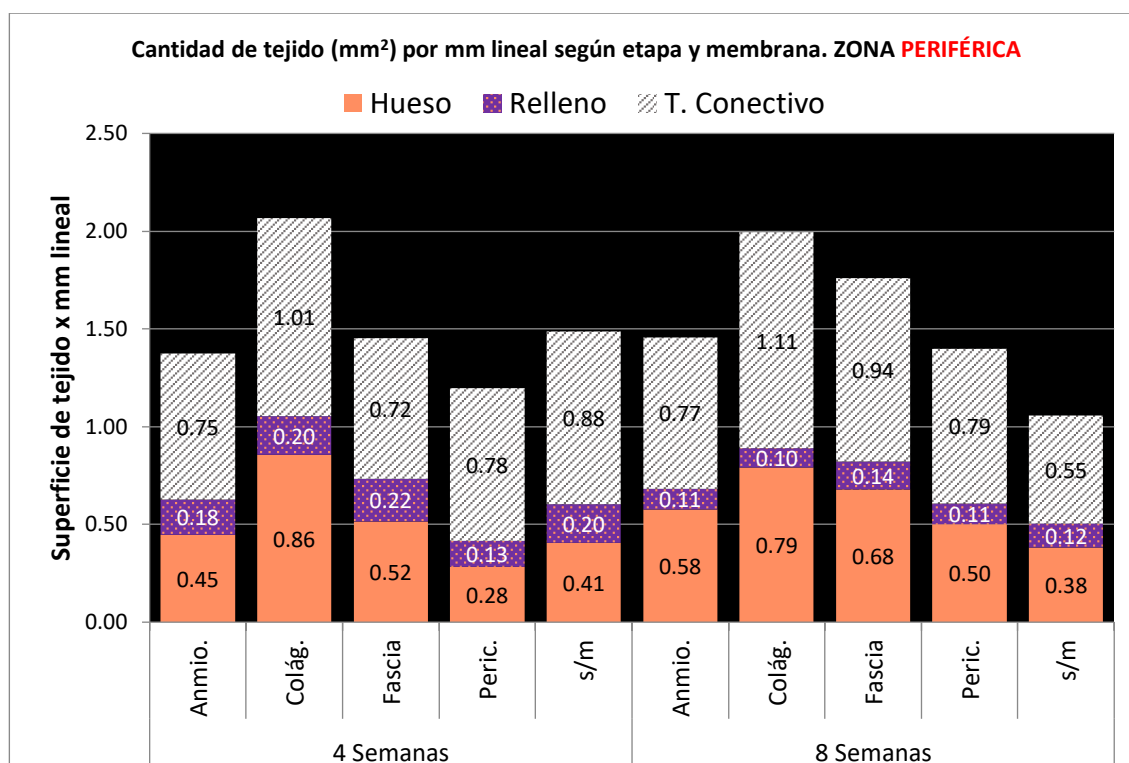
**Tabla 11:** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapa y membrana

Tiempo	Membrana	SUP NEO /mm horizontal		SUP INJERTO /mm horizontal		SUP CONECTIVO /mm horizontal	
		Central	Perif.	Central	Perif.	Central	Perif.
4 Semanas	Amniocoriónica	0,16	0,45	0,25	0,18	0,66	0,75
	Colágeno	0,21	0,86	0,25	0,20	1,33	1,01
	Fascia lata	0,16	0,52	0,23	0,22	0,71	0,72
	Pericardio	0,05	0,28	0,19	0,13	0,66	0,78
	Sin membrana	0,13	0,41	0,23	0,20	0,86	0,88
8 Semanas	Amniocoriónica	0,36	0,58	0,18	0,11	0,75	0,77
	Colágeno	0,28	0,79	0,15	0,10	1,22	1,11
	Fascia lata	0,24	0,68	0,26	0,14	1,03	0,94
	Pericardio	0,25	0,50	0,19	0,11	0,76	0,79
	Sin membrana	0,21	0,38	0,17	0,12	0,52	0,55

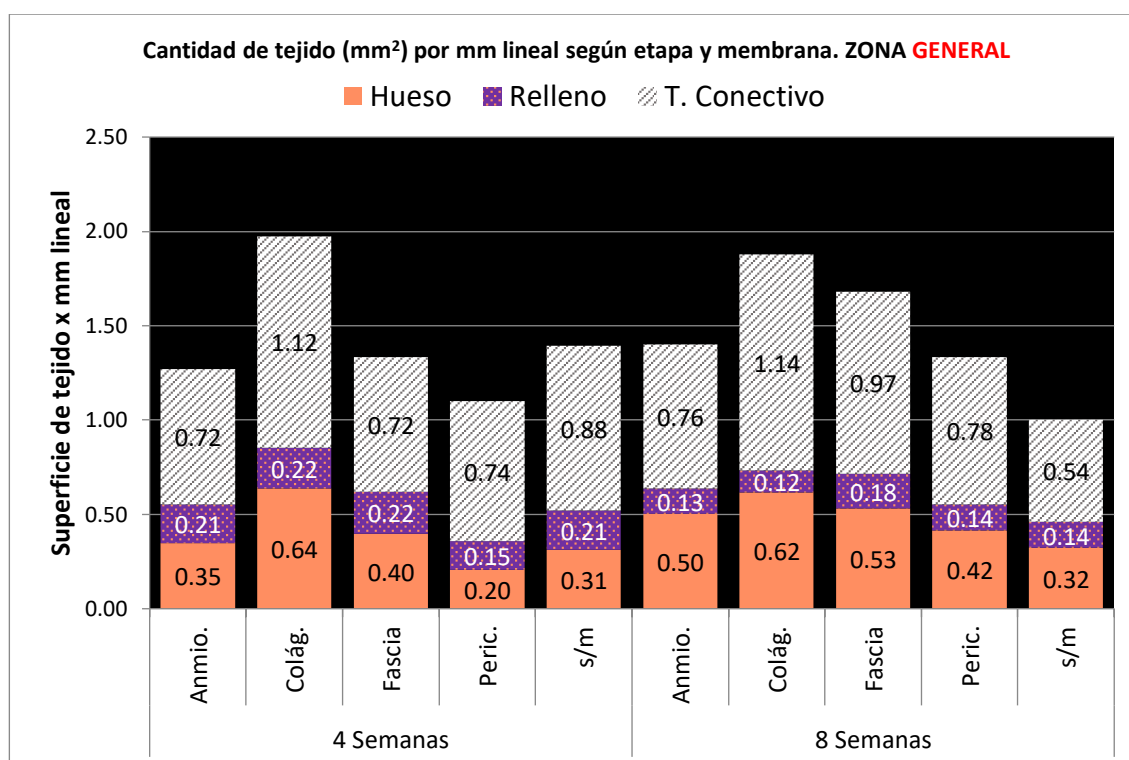
**Tabla 11.-** En la presente agrupación por membranas, vemos su desempeño en cuanto a la formación de tejidos y mantenimiento de los espesores.



**Fig. 33.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapas y membrana correspondientes a la zona central del defecto. En la zona más desfavorable del defecto se aprecian mejores resultados con amnio coriónica, colágeno y fascia lata.



**Fig. 34.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapas y membrana correspondientes a la zona periférica del defecto. En la zona menos desfavorable del defecto se aprecian mejores resultados con colágeno, fascia lata y amnio coriónica.



**Fig. 35.-** Cantidad de tejido (mm<sup>2</sup>) por mm lineal según etapas y membrana correspondientes a todo el defecto. Observamos que el mejor desempeño general lo protagoniza la membrana de colágeno, con muy buenos desempeños las membranas amnio coriónicas y de fascia lata y con un desempeño menor la membrana de pericardio porcino y el grupo control sin membrana.

### DENSIDAD RADIOGRÁFICA RELATIVA

Los porcentajes de densidad radiográfica relativa registrados en ambas etapas (4 y 8 semanas) según tipo de membrana y relleno del injerto se expresan en la tabla 12.

**Tabla 12:** Valores medios porcentajes de densidad radiográfica registrados a las 4 y 8 semanas según tipo de membrana y relleno del injerto. Para evidenciar las diferencias entre grupos y factores se utilizó una escala colorimétrica que se correlaciona con los porcentajes, las tonalidades rojas se asocian a bajas densidades y las tonalidades verdes a densidades elevadas.

Etapa	Membrana	Relleno	
		Sin relleno	BioOss
4 semanas	Sin membrana	65,4%	82,5%
	Colágeno	67,2%	84,3%
	Fasia Lata	66,3%	90,1%
	Amniocoriónica	62,3%	86,5%
	Pericardio	51,4%	75,1%
8 semanas	Sin membrana	64,4%	66,9%
	Colágeno	73,0%	84,4%
	Fasia Lata	75,8%	79,4%
	Amniocoriónica	74,2%	87,7%
	Pericardio	67,2%	70,3%

En el grupo “sin relleno” se observan incrementos a las 8 semanas respecto al control de 4 semanas en todos los grupos que utilizaron membranas, no así en la categoría “sin membrana”, en tanto que en el grupo que utilizó relleno (BioOss) los porcentajes de mineralización resultaron más elevados, pero con una ligera tendencia a disminuir estos valores con el tiempo en la mayoría de las categorías de membranas, proceso que se observó particularmente en los subgrupos sin membrana y en menor cantidad en las membranas de Fascia Lata y Pericardio.

### Análisis de la varianza

Con el objeto de evaluar la influencia de los factores: tipo de membrana de barrera, material de relleno y tiempo sobre la densidad radiográfica de las cavidades, se realizó un análisis de la varianza univariante multifactorial (ANOVA de tres vías).

**Tabla 13:** ANOVA de tres vías: Factores; Suma de cuadrados (SC); Grados de libertad (gl); Media cuadrática (MC); estadístico de Fisher (F) y significación estadística (p-valor). Variable dependiente: Porcentaje de mineralización.

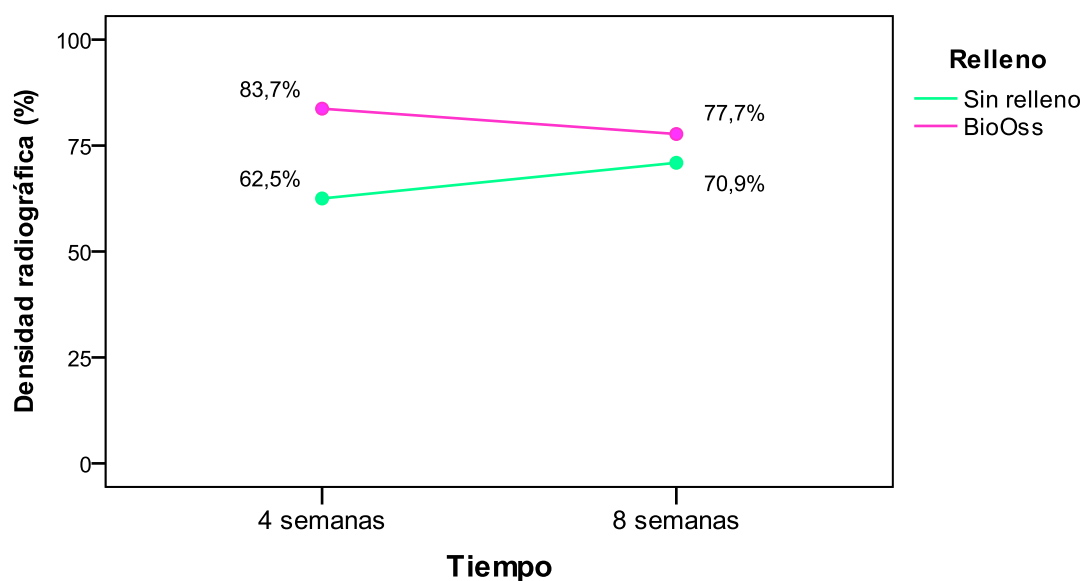
Factores	SC	gl	MC	F	(p-valor)
Membrana	1926,4	4	481,6	4,156	0,005
Tiempo	29,8	1	29,8	0,257	0,614
Relleno	3918,3	1	3918,3	33,817	< 0,001
Membrana * Tiempo	570,3	4	142,6	1,230	0,308
Membrana * Relleno	167,0	4	41,8	0,360	0,836
Tiempo * Relleno	1036,8	1	1036,8	8,948	0,004
Memb. * Tiempo * Relleno	159,5	4	39,9	0,344	0,847
Error	6952,1	60	115,9		

R cuadrado = 0,529 (R cuadrado corregida = 0,380)

De acuerdo al análisis precedente, el material de relleno resultó ser un factor muy significativo en relación a la densidad radiográfica ( $p < 0,001$ ), con valores mayores dentro del grupo Bio-Oss, tal como se mencionó al interpretar los porcentajes de la tabla 12. También resultó significativo el efecto de la variable membrana ( $p = 0,005$ ;  $p < 0,05$ ).

La interacción entre las variables relleno y tiempo resultó también significativa ( $p = 0,004$ ;  $p < 0,05$ ), la evolución de la densidad radiográfica fue diferente en especímenes sin relleno y aquellos con relleno Bio-Oss, en el primer caso los porcentajes se incrementaron sugiriendo un proceso “natural” de mineralización u osificación (62,5% a 70,9%), en tanto que el grupo con relleno mostró una respuesta o tendencia opuesta, con valores medios de porcentajes de mineralización elevados a las cuatro semanas para luego disminuir ligeramente estos valores (83,7% a 77,7%), situación que puede observarse con claridad en la figura 36, con una tendencia convergente de ambos grupos (con y sin relleno) en función del tiempo, achicándose las diferencias entre ellos, de 21,2% a las 4 semanas a 6,8% a las ocho semanas.





**Fig. 36.-** Densidad radiográfica media (%) según material de relleno y etapa. Se observa una tendencia de convergencia de valores hacia la octava semana producto de la pérdida de mineralización de los defectos injertados y aumento de mineralización de los vacíos

Se verificaron diferencias significativas entre las membranas utilizadas ( $p=0,005$ ;  $p<0,05$ ), con valores medios de densidad radiográfica significativamente menores en los grupos con membrana de pericardio y sin membrana respecto a los grupos con membranas *amniocoriónica*, de *colágeno* y *fascia lata*. Con respecto al factor tiempo, en términos globales no resultó significativo ( $p=0,614$ ;  $p>0,05$ ).

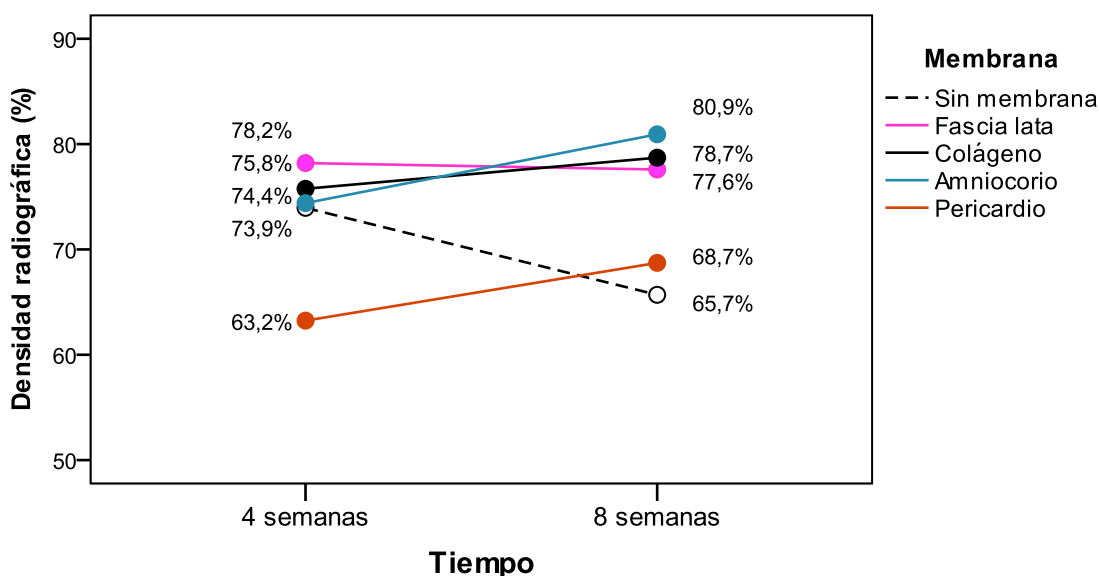
**Tabla 14:** Densidad radiográfica porcentual según membrana

Membrana	n	Subconjunto	
		1	2
Pericardio	16	66,0	
Sin membrana	16	69,8	
Colágeno	16		77,2
Amniocoriónica	16		77,7
Fascia lata	16		77,9
Sig.		0,851	0,225

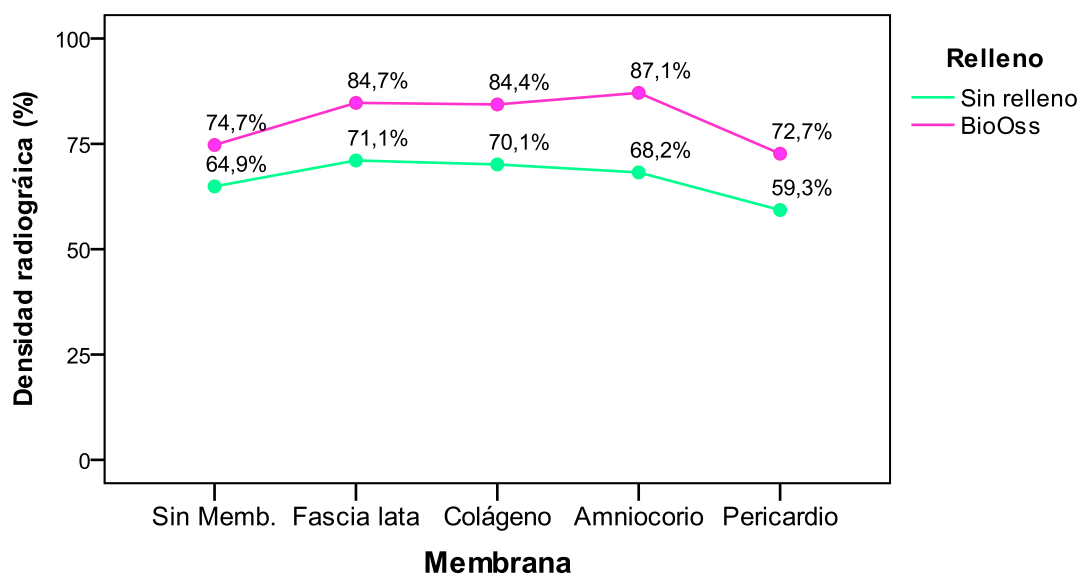
**Tabla 14:** DHS de Tukey. Se muestran las medias de densidad radiográfica en subconjuntos homogéneos. Se conformaron dos subconjuntos homogéneos.

La membrana **fascia lata** registró el mayor porcentaje de mineralización de todas las categorías de membrana (77,9% de media general), seguida en orden descendente por **amniocoriónica** (77,7%), **colágeno** (77,2%); sin membrana (69,8%) y por último **pericardio** (66%).

La visión generalizada de la evolución de densidad según membrana observada en la tabla 25, que no discrimina según material de relleno, deja en evidencia una marcada disminución de densidad con el tiempo en los casos “sin membrana”, situación que se verificó tanto en cavidades sin relleno como con Bio-Oss. En tanto que la densidad media en el grupo que usó fascia lata se mantuvo casi sin cambios entre etapas, por último, los casos en los que se utilizaron membranas de colágeno, amniocoriónica y pericardio registraron incrementos de densidad a las 8 semanas.



**Fig. 37.-** Porcentajes de densidad radiográfica (media) según tipo de membrana y tiempo. Al tomar el conjunto de defectos (rellenos y vacíos) y analizarlos por membrana se observa que el grupo sin membrana es el único que perdió densidad radiológica de las 4 a las 8 semanas.

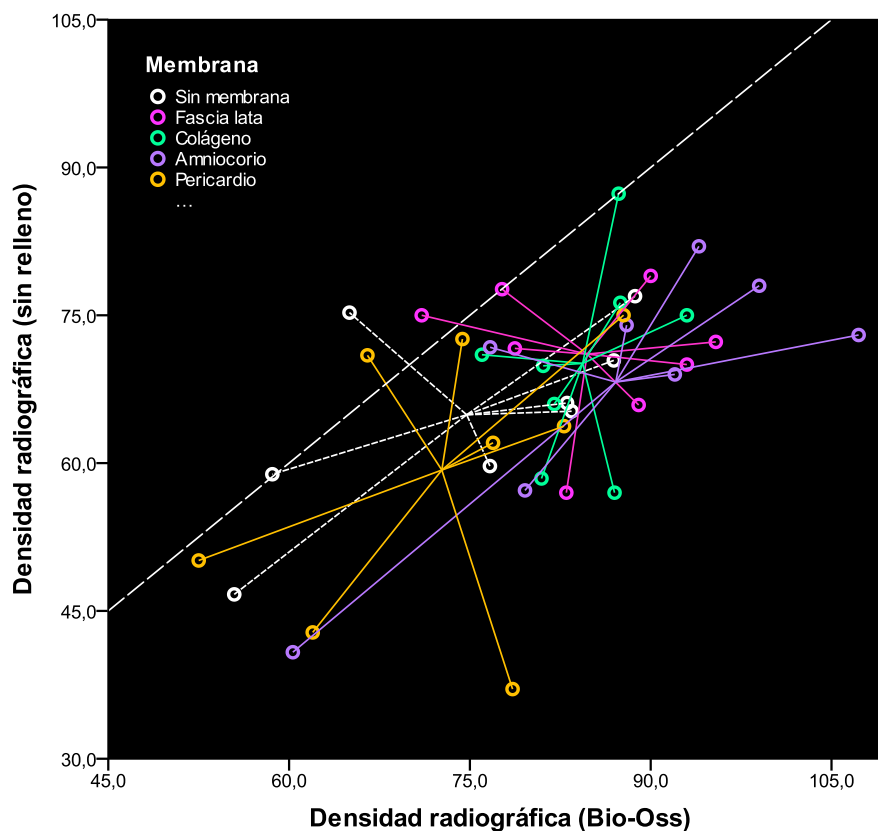


**Fig. 38.-** Porcentajes de densidad radiográfica (media) según material de relleno y membrana. Se observa que las medias porcentuales de densidad según relleno difieren en todos los tipos de membrana, siempre con valores mayores al utilizar relleno Bio-Oss.

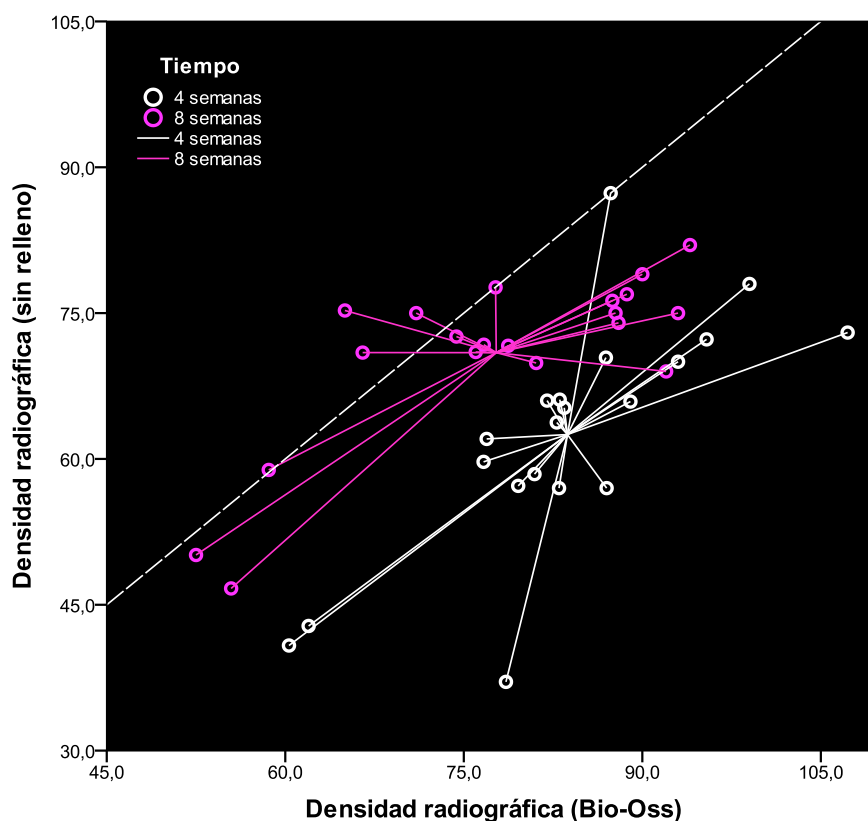
### Análisis complementario (Muestras relacionadas)

Los valores de porcentajes de densidad radiográfica representados en los gráficos de dispersión de las figuras 39 y 40 son iguales, pero en el primero los conglomerados están agrupados según tipo de membrana y en el segundo según tiempo. Los puntos (círculos) de estos gráficos corresponden a cada uno de los casos evaluados y representan los pares de valores porcentuales obtenidos en cada espécimen conejo en diferentes zonas de la calota, un valor corresponde a la cirugía sin relleno o defecto vacío y el otro al defecto relleno con material Bio-Oss. Estas representaciones gráficas son útiles para mostrar tendencias grupales en muestras relacionadas como en este caso.

Al evaluar los tipos de membrana, se aprecia que el centroide del grupo fascia lata se ubica más arriba que el resto, debido a que los porcentajes medios de este conjunto son los mayores en cavidades sin relleno (el grupo colágeno se ubicó muy próximo a fascia lata), en tanto que el centroide correspondiente a la membrana amniocoriónica es el que se ubicó más a la derecha de todos, dado que registró la densidad radiográfica media más elevada dentro del grupo con relleno Bio-Oss. Los grupos fascia lata y colágeno muestran las menores dispersiones. El grupo que usó pericardio registró los valores más bajos de mineralización (sin relleno y con relleno).



**Fig. 39.-** Diagrama de dispersión: Porcentajes de densidad radiográfica en casos sin relleno vs casos con relleno Bio-Oss según tipo de membrana.



**Fig. 40.-** Diagrama de dispersión: Porcentajes de densidad radiográfica en casos sin relleno vs casos con relleno Bio-Oss según material de relleno.

En la figura 40 queda en evidencia la diferencia entre etapas de forma general, la tendencia del conglomerado de puntos del grupo de sacrificio temprano (4 semanas), representado por el centroide o centro geométrico de los valores del plano, se posiciona más abajo y a la derecha respecto al grupo de valores correspondiente a los conejos sacrificados a las 8 semanas, lo cual ratifica lo analizado con anterioridad, que en la primer etapa los porcentajes de mineralización son mayores en defectos rellenos con material Bio-Oss pero menores en los que no se rellenan y a las ocho semanas la situación se invierte, con incrementos en los porcentajes en casos sin relleno y una disminución en los que habían sido rellenos con Bio-Oss.

En las figuras precedentes se observa la tendencia de aumento de densidad en cavidades sin relleno en función del aumento densitométrico en cavidades con relleno Bio-Oss (siempre considerando pares de valores de densidad por conejo) y que de acuerdo al resultado de la prueba de correlación de Spearman el grado de correlación entre los valores con y sin relleno es significativo (Corr. de Pearson=0,574;  $p < 0,001$ ), lo cual implica que el factor intra-sujeto (especimen) es significativo respecto a la densidad radiográfica medida. El determinante ( $R^2$ ) indica un ajuste moderado de los valores para un modelo de regresión lineal general ( $R^2$  lineal=0,329).

Al considerar cada etapa por separado, se verificaron correlaciones aún más marcadas y significativas: a las 4 semanas (Corr. =0,813;  $p < < 0,001$ ) y a las 8 semanas (Corr.=0,828;  $p < < 0,001$ ).

**HISTOMORFOMETRÍA****Tejido DURO (H+R)**

Los valores cantidad de tejido duro: Hueso más relleno, (H+R) registrados en ambas etapas (4 y 8 semanas) según tipo de membrana y relleno del injerto se expresan en la tabla 15.

**Tabla 15.** Valores medios de superficie de tejido duro (H+R) por milímetro lineal registrados a las 4 y 8 semanas según tipo de membrana y relleno del injerto. Para evidenciar las diferencias entre grupos y factores se utilizó una escala colorimétrica que se correlaciona con los valores, las tonalidades rojas se asocian a poco tejido y las tonalidades verdes a mucho tejido duro.

Etapa	Membrana	Relleno (mm <sup>2</sup> )	
		Sin relleno	Bio-Oss
4 semanas	Sin membrana	0,32	0,73
	Colágeno	0,43	0,81
	Fascia Lata	0,63	0,92
	Amniocoriónica	0,35	0,76
	Pericardio	0,17	0,55
8 semanas	Sin membrana	0,52	0,39
	Colágeno	0,62	0,68
	Fascia Lata	0,77	0,61
	Amniocoriónica	0,56	0,61
	Pericardio	0,36	0,53

En el grupo “sin relleno” se observan incrementos a las 8 semanas respecto al control de 4 semanas en todos los grupos, en tanto que en el grupo que utilizó relleno (Bio-Oss) los valores de cantidad de tejido duro disminuyeron a las 8 semanas, proceso que se observó particularmente en los subgrupos sin membrana y en menor cantidad en las membranas de Fascia Lata.

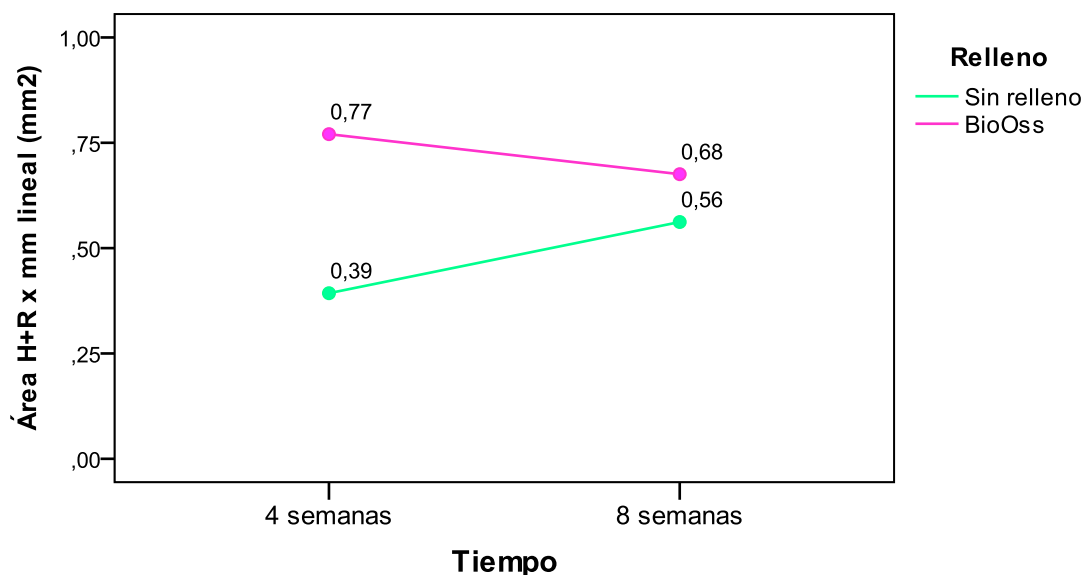
### Análisis de la varianza

Con el objeto de evaluar la influencia de los factores: tipo de membrana de barrera, material de relleno y tiempo sobre la cantidad de tejido duro dentro de las cavidades, se realizó un análisis de la varianza univariante multifactorial (ANOVA de tres vías).

**Tabla 16:** ANOVA de tres vías: Factores; Suma de cuadrados (SC); Grados de libertad (gl); Media cuadrática (MC); estadístico de Fisher (F) y significación estadística (p-valor). Variable dependiente: Superficie de tejido duro (H+R)

Factores	SC	gl	MC	F	(p-valor)
Membrana	1,189	4	0,297	16,271	< 0,001
Tiempo	0,027	1	0,027	1,498	0,226
Relleno	1,205	1	1,205	65,959	< 0,001
Membrana * Tiempo	0,258	4	0,064	3,524	0,012
Membrana * Relleno	0,016	4	0,004	0,212	0,931
Tiempo * Relleno	0,348	1	0,348	19,069	< 0,001
Memb. * Tiempo * Relleno	0,058	4	0,014	0,792	0,535
Error	1,097	60	0,018		
R cuadrado = 0,739 (R cuadrado corregida = 0,656)					

De acuerdo al análisis precedente, el factor material de relleno mostró un efecto muy significativo (el más significativo) sobre la densidad de tejido óseo neo formado y/o material de relleno residual ( $p=3,0 \times 10^{-11}$ ;  $p < 0,05$ ), también el efecto del factor membrana resultó muy significativo ( $p=4,5 \times 10^{-9}$ ;  $p < 0,05$ ). Al profundizar el análisis mediante test post-hoc (test de Tukey) se verificó que al utilizar membrana colágena los valores de tejidos H+R resultaron significativamente mayores que al usar las otras membranas, con excepción de fascia lata, en el otro extremo se ubicó el grupo sin membrana y pericardio. Además, se verificó interacción entre el factor tiempo y los factores relleno y membrana, no así entre relleno y membrana. Con respecto al factor tiempo, en términos globales no resultó significativo ( $p=0,226$ ;  $p > 0,05$ ), aunque si es destacable la tendencia a converger de ambos grupos (con y sin relleno) achicándose las diferencias entre ellos, de  $0,38 \text{ mm}^2$  a las 4 semanas a  $0,12 \text{ mm}^2$  a las ocho semanas, independientemente de la membrana usada.



**Fig. 41.-** Superficie de tejido duro según material de relleno y etapa. se observa la disminución de la cantidad (mm<sup>2</sup>x mm) de la sumatoria de hueso nuevo más relleno de las 4 a las 8 semanas.

Se verificaron diferencias significativas entre las membranas ( $p=0,005$ ;  $p<0,05$ ), con valores medios de densidad radiográfica significativamente menores en los grupos con membrana de pericardio y sin membrana respecto a los grupos con membranas *amniocoriónica*, de *colágeno* y *fascia lata*. Con respecto al factor tiempo, en términos globales no resultó significativo ( $p=0,614$ ;  $p>0,05$ ).

**Tabla 17:** Área H+R x mm lineal (mm<sup>2</sup>) según membrana

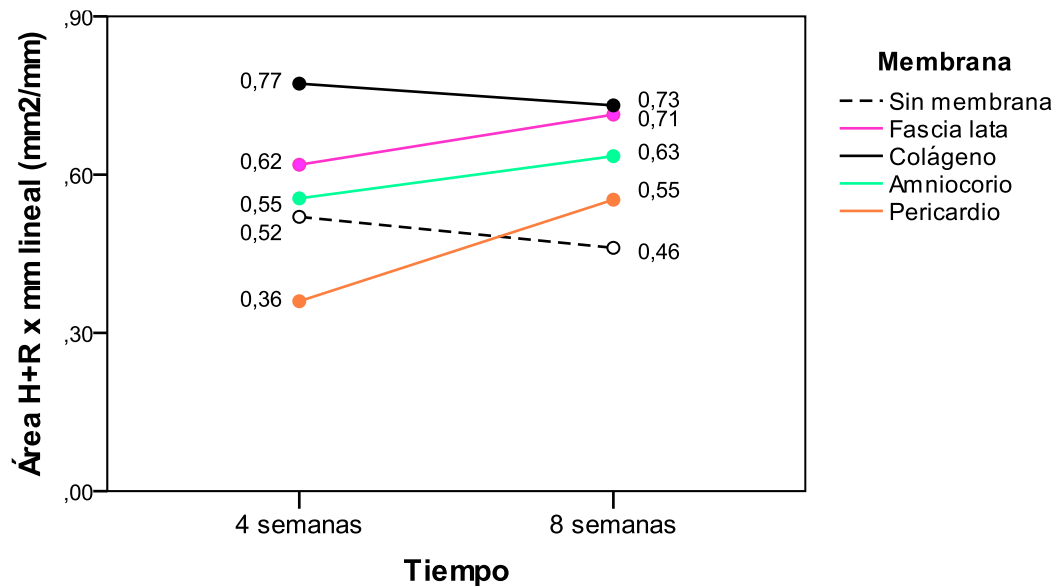
Membrana	n	Subconjunto		
		1	2	3
Pericardio	16	0,456		
Sin membrana	16	0,491		
Amniocorio	16		0,595	
Fascia lata	16		0,666	
Colágeno	16			0,793
Sig.		0,951	0,882	1,000

**Tabla 17:** DHS de Tukey. Se muestran las medias de superficie de tejido duro en subconjuntos homogéneos. Se conformaron tres subconjuntos homogéneos.

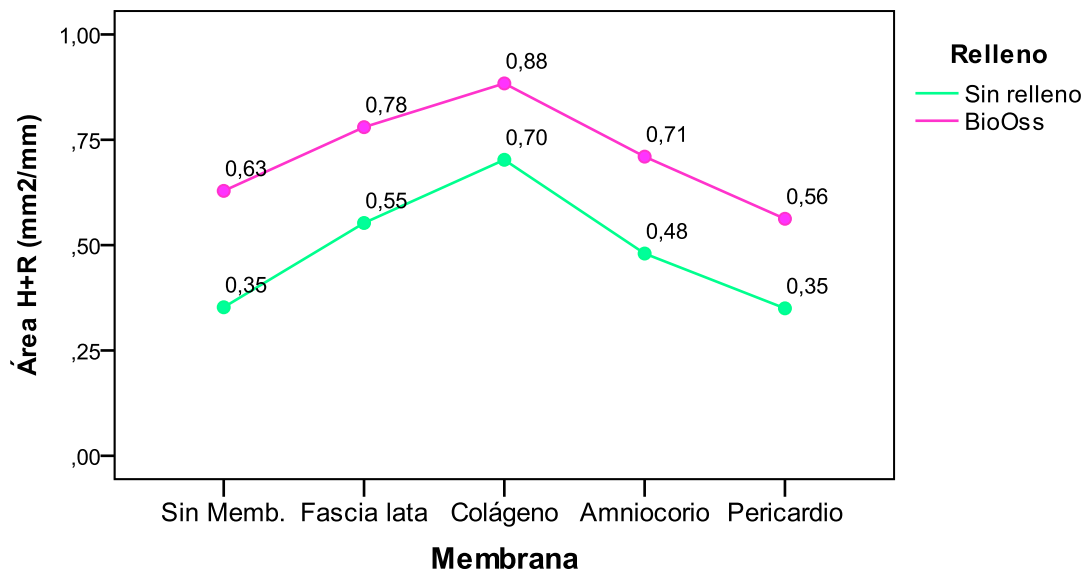
El grupo que usó membrana **colágena** registró el mayor valor medio de cantidad de tejido duro (por mm lineal), las membranas de **fascia lata** y la amniocoriónica registraron valores intermedios y por último el grupo **sin membrana** y el de **pericardio** fueron los de menores valores. Las membranas que conforman determinado subconjunto homogéneo no se

diferencias entre sí, por el contrario, las diferencias entre membranas de diferentes subconjuntos son significativas.

La visión generalizada de la evolución de densidad según membrana, que no discrimina según material de relleno, muestra que los casos “sin membrana” experimentan una considerable disminución de densidad de tejidos duros con el tiempo, pero al profundizar se verificó que esta situación sólo se manifestó en cavidades rellenas con Bio-Oss. También se observó una leve disminución en la membrana colágena, aunque se mantuvo liderando los grupos a las 8 semanas.



**Fig. 42.-** Superficie de tejido duro (media) según tipo de membrana y tiempo. Se observa pérdida de la sumatoria del hueso nuevo más relleno en los grupos sin membrana y colágeno entre las 4 y 8 semanas



**Fig. 43.-** Superficie de tejido duro (media) según material de relleno y membrana. se observa que las medias porcentuales de cantidad de tejido duro según relleno difieren en todos los tipos de membrana, siempre con valores mayores al utilizar relleno Bio-Oss.



## HISTOMORFOMETRÍA

### Tejido óseo NEOFORMADO

Los valores cantidad de tejido neo formado (hueso) registrados en ambas etapas (4 y 8 semanas) según tipo de membrana y relleno del injerto se expresan en la tabla 18.

**Tabla 18:** Valores medios de superficie de tejido neo formado por milímetro lineal registrados a las 4 y 8 semanas según tipo de membrana y relleno del injerto. Para evidenciar las diferencias entre grupos y factores se utilizó una escala colorimétrica que se correlaciona con los valores, las tonalidades rojas se asocian a poco tejido y las tonalidades verdes a mucho tejido neo formado.

Etapa	Membrana	Relleno (mm <sup>2</sup> )	
		Sin relleno	Bio-Oss
4 semanas	Sin membrana	0,32	0,31
	Colágeno	0,60	0,50
	Fascia Lata	0,43	0,36
	Amniocoriónica	0,35	0,35
	Pericardio	0,17	0,24
8 semanas	Sin membrana	0,39	0,32
	Colágeno	0,61	0,63
	Fascia Lata	0,67	0,39
	Amniocoriónica	0,61	0,40
	Pericardio	0,53	0,30

En el grupo que utilizó relleno (Bio-Oss) los porcentajes de neoformación fueron menores que sin relleno en ambas etapas, al respecto cabe mencionar que la distribución espacial del hueso neo formado fue muy diferente en ambos grupos (con y sin relleno), en los casos sin relleno se presentaron islotes compactos al centro y crecimiento desde la periferia del defecto y en las cavidades rellenas se observó un crecimiento distribuido por todo el volumen, mayormente envolviendo a las partículas de relleno. En ambos grupos se observó un crecimiento en función del tiempo.

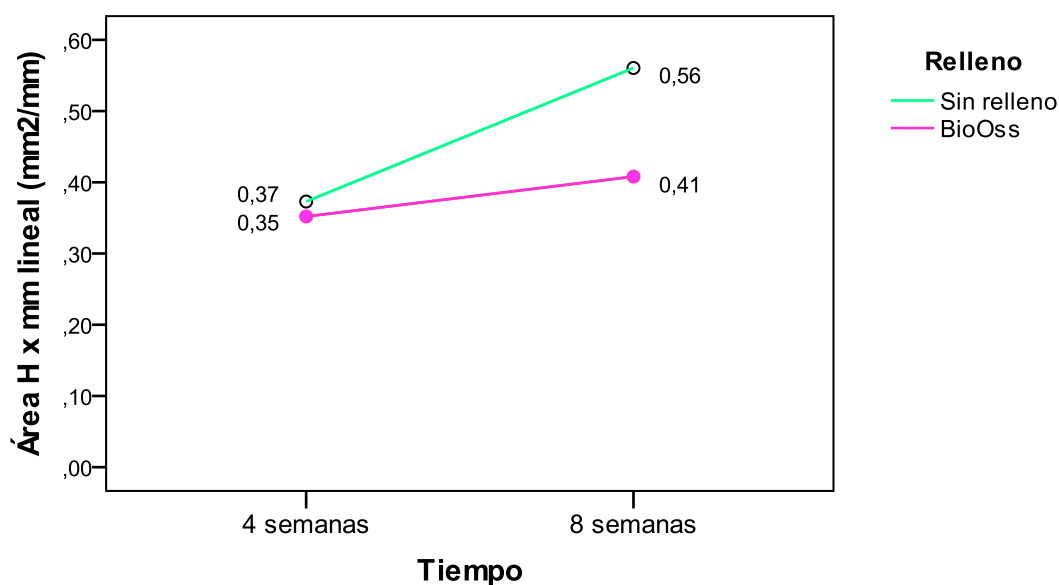
### Análisis de la varianza

Con el objeto de evaluar la influencia de los factores: tipo de membrana de barrera, material de relleno y tiempo sobre la formación de tejido óseo dentro de las cavidades, se realizó un análisis de la varianza univariante multifactorial (ANOVA de tres vías).

**Tabla 19:** ANOVA de tres vías: Factores; Suma de cuadrados (SC); Grados de libertad (gl); Media cuadrática (MC); estadístico de Fisher (F) y significación estadística (p-valor). Variable dependiente: Porcentaje de mineralización.

Factores	SC	gl	MC	F	(p-valor)
Membrana	0,769	4	0,192	12,895	1,2E-07
Tiempo	0,296	1	0,296	19,875	3,7E-05
Relleno	0,151	1	0,151	10,090	0,002
Membrana * Tiempo	0,072	4	0,018	1,211	0,315
Membrana * Relleno	0,048	4	0,012	0,806	0,526
Tiempo * Relleno	0,086	1	0,086	5,796	0,019
Memb. * Tiempo * Relleno	0,112	4	0,028	1,874	0,127
Error	0,895	60	0,015		
R cuadrado = 0,632 (R cuadrado corregida = 0,515)					

El factor membrana mostró el efecto más significativo sobre la neo formación ósea ( $p=1,2 \times 10^{-7}$ ;  $p < 0,05$ ), le siguió el factor tiempo ( $p=3,7 \times 10^{-5}$ ;  $p < 0,05$ ), y en menor grado el factor relleno ( $p=2,0 \times 10^{-3}$ ;  $p < 0,05$ ). Al profundizar el análisis mediante test post-hoc (test de Tukey) se verificó que al utilizar membrana colágena los valores de tejidos neo formación ósea resultaron significativamente mayores que al usar las otras membranas, de fascia lata y amniocoriónica mostraron un efecto similar con valores intermedios, y en el otro extremo con menores valores se ubicaron los grupos sin membrana y pericardio. Además, se verificó interacción entre el factor tiempo y relleno, porque ambos grupos evolucionaron de formas diferentes, el sin relleno lo hizo más aceleradamente.



**Fig. 44.-** Superficie de tejido neo formado según material de relleno y etapa. Se evidencia aumento de hueso nuevo en ambas situaciones, pero el crecimiento es mayor en los casos sin relleno agregado.

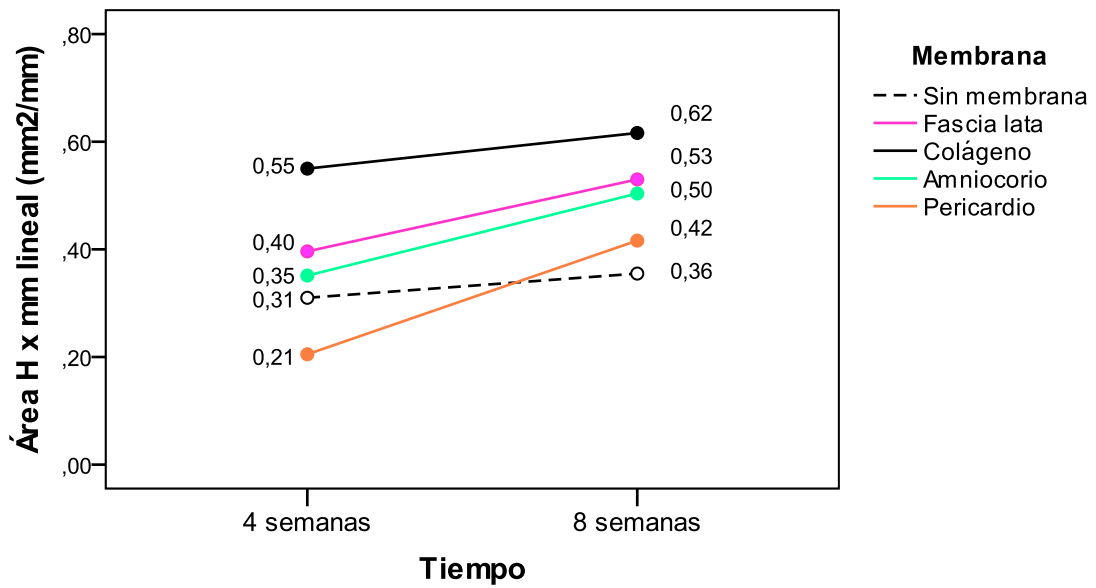
**Tabla 20:** Área H+R x mm lineal (mm<sup>2</sup>) según membrana

Membrana	n	Subconjunto		
		1	2	3
Pericardio	16	0,31		
Sin membrana	16	0,33		
Anniocoriónica	16		0,43	
Fascia lata	16		0,46	
Colágeno	16			0,58
Sig.		0,065	0,922	0,054

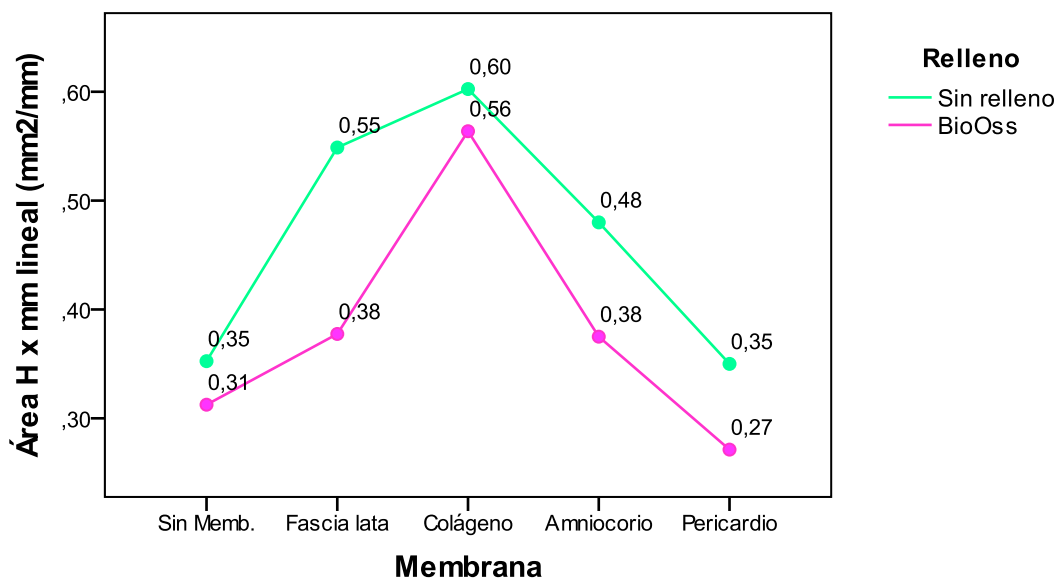
**Tabla 20:** DHS de Tukey. Se muestran las medias de superficie de tejido neo formado en subconjuntos homogéneos. Se conformaron tres subconjuntos homogéneos.

El grupo que usó membrana **colágena** registró el mayor valor medio de cantidad de tejido neo formado (por mm lineal), las membranas de **fascia lata** y la amniocoriónica registraron valores intermedios y por último el grupo **sin membrana** y el de **pericardio** fueron los de menores valores. Las membranas que conforman determinado subconjunto homogéneo no se diferencian entre sí, por el contrario, las diferencias entre membranas de diferentes subconjuntos son significativas.

La visión generalizada de la evolución de la neo formación ósea según membrana, que no discrimina según material de relleno, indicaría que el menos favorable fue el grupo "sin membrana y el más favorable el grupo de membrana colágena.



**Fig. 45.-** Superficie de tejido neo formado (media) según tipo de membrana y tiempo. Se observa que las medias hueso neo formado según relleno difieren en todos los tipos de membrana, siempre con valores **menores** al utilizar relleno Bio-Oss



**Fig. 46.-** Superficie de tejido neo formado (media) según material de relleno y membrana. Observamos las medias según relleno y membrana, siendo mayores en todos los casos los defectos sin relleno.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

Resulta necesario encontrar tratamientos que permitan revertir situaciones de pérdida ósea en los maxilares, el estudio *in vitro* y *in vivo* en animales representa un precedente importante y necesario previo a la experimentación clínica. La utilización de defectos críticos en animales de experimentación es un procedimiento ampliamente utilizado y validado internacionalmente.

Compartimos con Silva A. *et al*, que defecto de tamaño crítico, es definido como la herida intraósea más pequeña en un animal que no se cura espontáneamente, si no es tratada, durante un cierto período de tiempo. Esto ha sido ampliamente utilizado como modelo experimental para evaluar la efectividad de los nuevos desarrollos en biomateriales. Esta definición confirma que los defectos quirúrgicos creados en la calota de los animales de esta investigación fueron de tamaño crítico, como lo establece la dinámica de cicatrización de la especie. (35, 39, 40, 41, 42)

Adherimos con Sohn *et al*, cuando postula, “el cráneo de conejo es adecuado para acomodar cuatro defectos óseos mientras se comparan simultáneamente varios biomateriales, evitando así la variación individual”, además nos permite aprovechar un alto N con un número reducido de ejemplares lo que cumple con los postulados de bioética animal. (35)

En cuanto a la utilización de micro tomografía de alta resolución para evaluar “periodos de cicatrización” entendido esto como cantidad de calcificación presente en la zona, acordamos con Misch *et al.*, quienes evaluaron cambios en defectos óseos creados en las mandíbulas y concluyó que la capacidad tridimensional de tomografía de haz de cono (CBCT) tiene una ventaja significativa sobre los métodos convencionales porque todo el defecto es detectado y cuantificado.

Además, Kehl *et al.*, quienes evaluaron el nivel óseo marginal alrededor de implantes dentales con el CBCT definen que este tipo de estudios permite un análisis cuantitativo más preciso de pérdida ósea también en comparación con la radiografía convencional (dos dimensiones). (42, 44)

En el presente estudio, microtomográficamente, se encontró más material no calcificado en el grupo de control (sin relleno agregado) que en los grupos con relleno. Esto está de acuerdo con Calvo Guirado *et al.*, quienes compararon HA-b TCP solo, HA-bTCP con agregado de sílice y defectos vacíos en calotas de conejos y hallaron cantidades significativamente mayores de tejido conectivo en los grupos control que en los grupos con diferentes rellenos. (15)

Tal como sostienen Turri *et al.*, desde hace años viene demostrándose –tanto en experimentación como en el ámbito clínico– que la combinación de una membrana de barrera y diversos materiales de sustitución ósea posee una actividad sinérgica que permite lograr la regeneración ósea “predecible” con un resultado exitoso a largo plazo, en particular en tratamientos de implantes orales. (16, 17, 45)

Como quedó demostrado histológicamente, en el presente trabajo y dentro de los límites del mismo, la arquitectura espacial de la reparación resulta más predecible y adecuada para posteriores intervenciones, como podría ser la colocación de implantes.

Por otro lado, Aloise *et al.*, quienes compararon un andamio xenográfico enriquecido con *stem cells* de médula ósea (TG), material osteoconductor xenográfico sin enriquecer (NGC) y hueso autólogo (PCG) con y sin membrana colágena de cobertura en conejos, encontraron que el uso de membrana produciría un efecto sinérgico en la cicatrización ósea en PCG y en NGC, pero no así en TG. Cuando se usaron células pluripotenciales de médula ósea, no hubo diferencias entre los distintos tipos de membranas. (22)

Esto concuerda con Delgado-Ruiz *et al.*, quienes concluyen que la adición de *stem cells* de diferentes orígenes al material de injerto incrementa la formación ósea en el transcurso del período de cicatrización temprana. (46)

Lo cual estaría de acuerdo, con los resultados obtenidos que dan valores absolutos menores de hueso neo formado en los casos donde se empleó relleno óseo en comparación con los defectos vacíos, dado que la presencia del relleno dificulta al huésped el aporte de células óseas obligándolo a hacerlo de un patrón espacial determinado.

Según Martínez *et al.*, quienes comparan hueso bovino desproteinizado con fosfato tricálcico en fase beta en calotas de conejos, la acción de la membrana como un potenciador del crecimiento óseo se infiere por el cierre completo del defecto en los sitios de control, a pesar de que hay un colapso parcial de la membrana, resultando afirmado esto en el presente trabajo dado que todas las membranas estudiadas resultaron en mayor cantidad de hueso neo formado al cabo de las 8 semanas comparadas con el grupo “sin membrana”. (24)

Hammerle y Jung, inducen la reparación de la red de hueso en el espacio por debajo de la membrana, y para algunos autores, como Donos *et al.*, esta es el elemento principal en la curación del defecto óseo.

Es probable, tal como indican Martínez *et al.*, que la naturaleza del injerto sustituto juegue un rol relevante en la cantidad de hueso formado. (24, 28, 47, 48)

Asimismo, la reabsorción de los injertos óseos ha sido un problema tanto para investigadores como para clínicos. Desde hace muchos años, se cree que el origen embrionario de los injertos desempeña un papel importante en su capacidad de reabsorción, y que los injertos de origen membranoso son capaces de resistir mejor la reabsorción que

los de origen endocondral. Pero estudios más recientes revelaron que la proporción entre hueso cortical y trabecular pesa más que el origen embrionario del injerto. (49, 50, 51, 52)

En el presente trabajo se utilizó Bio-Oss, sustituto óseo bovino desproteinizado esponjoso de partículas finas, que es el de mayor velocidad de reabsorción de la gama, lo que concuerda con el hecho de que el nivel de reabsorción sea mayor que el de neo formación, produciendo la caída en los indicadores de mineralización a las 8 semanas cuando los comparamos con los de 4 semanas, tanto a nivel de densidad radiográfica relativa como cuando evaluamos hueso nuevo más relleno contra vacíos, sin perder de vista que la arquitectura de la reparación resulta mejor en los defectos con relleno aunque la cantidad neta de hueso nuevo sea menor.

Como establece Martínez et al “El crecimiento óseo es significativamente más rápido en los sitios de hueso bovino desproteinizado (DBB), pero, a diferencia de los sitios de fosfato beta tricálcico (BTCP), la presencia de partículas remanentes de DBB parece disminuir la fracción ósea a largo plazo”.

Recientemente O'zkan E et al, en un estudio realizado en ratas donde estudia el efecto de la terapia de onda de choque electro hidráulica sobre la reparación de defectos óseos tratados con injertos particulados evaluado con microtomografía de alta resolución e histología plantea, que, durante el período de curación, los aloinjertos presentes en la región del defecto inicialmente sufren resorción debido al aumento de la actividad osteoclástica, lo que reduce la radiopacidad. El nuevo hueso no está organizado en la semana 4 de curación, pero reemplaza al tejido del injerto en un lugar bien organizado en la semana 8 de curación. Pero el autor sugiere que el aumento de actividad osteoclástica y pérdida de densidad radiográfica a las 4 semanas, se debe a la terapia de choque y además se debe tener en cuenta al huésped, dado que la actividad metabólica es mayor en ratones (mayor grado de reabsorción/reparación en el mismo periodo de tiempo) por lo que esto no representa una contradicción con el presente trabajo. (24, 53, 54)

Resulta interesante recordar que, tal como establecen Delgado Ruiz *et al.*, el grado de compactación del material de injerto tiene una relación directa con su grado de reabsorción. En el presente trabajo, por tratarse de un defecto óseo crítico de espesor total, el grado de compactación fue mínimo, dado que la presión ejercida habría enviado material de injerto al interior del cráneo de los especímenes. (19)

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

En un reciente estudio, Esfahanizadeh et al (2019), estudiaron biomateriales en cabeza de conejos con una técnica similar al presente, aunque ellos analizaron la cantidad de osteoblastos y osteocitos en las muestras, pero resulta llamativo, observando la tabla 1 y la



figura 4 del trabajo, la escasísima cantidad de hueso nuevo que le asignan al defecto de control (vacío), lo que parece contraponerse con el presente estudio y con la dinámica de cicatrización de la especie. (55).

Respecto de la pérdida de densidad radiográfica (tabla 23) entre las 4 y 8 semanas en los defectos injertados con Bio-Oss concordamos con Pripatnanont *et al*, que “aunque las radiografías convencionales proporcionaron información inexacta de la densidad ósea, que incluían la radio densidad de la parte inorgánica del material de injerto y hueso natural, el aumento densidad de 2 a 8 semanas en el grupo de defectos sin relleno se podría inferir como acumulación ósea.

Este fenómeno no puede ser aplicable a los defectos de grupos rellenos ya que tanto el hueso autógeno como el fosfato bifásico nano cálcico (BCP), se sometió a un proceso de reabsorción simultáneamente con el proceso de formación ósea. La densidad radiográfica del grupo autólogo mostró una densidad decreciente a las 8 semanas, lo que implicó que la reabsorción de las astillas de hueso injertadas y que el proceso de remodelación fue más avanzado que la formación ósea y que la densidad de formación ósea en esta etapa no maduró tanto como el injerto originalmente agregado”, en nuestro caso se puede afirmar que el Bio-Oss que se reabsorbió es más denso radiográficamente que el hueso nuevo que se formó. (58)

De todas formas, el material mineralizado total, resultante de la sumatoria de injerto más hueso nuevo (tabla 12) resulta mayor que el hueso nuevo en los defectos sin relleno lo cual nos lleva a coincidir con Cardaropoli *et al*, quien postula, “Histológicamente, el material de xenoinjerto asegura una gran fracción mineralizada con la formación de hueso nuevo” y con la topografía de la reparación. (63)

El hecho de que en todos los casos encontráramos mayor cantidad media de hueso nuevo en los defectos que no tenían relleno de injerto, Tabla 42, nos hace compartir con Yip *et al*, quien plantea que “Por lo tanto, era probable que la presencia de biomateriales influyó en la biología natural de la curación ósea”, interfiriendo en la normal cicatrización ya que el huésped tiene que reabsorber el injerto además de formar el nuevo hueso entre las partículas del mismo, lo que le obliga a hacerlo en un patrón espacial que no es natural, pero que para nuestros fines rehabilitadores resulta mucho más favorable. (59)

Respecto de la correlación de resultados entre ambas fases del estudio, microtomografía de alta resolución e Histomorfometría, concordamos con Thoma *et al*, quien plantea que “Los análisis de microtomografía parecían ser menos sensibles en comparación con los análisis histológicos. Esta puede deberse al valor de umbral que se ha utilizado para los diversos tejidos. Estudios previos comparando medidas histológicas y micro-CT demostraron datos controvertidos. Un estudio *in vitro* mostró altas correlaciones entre histomorfométrico y

análisis de micro-tomografía (Thimm *et al.* 2013), mientras que otros afirmaron que, para obtener conclusiones válidas, el análisis debe usarse en combinación (Gielkens *et al.* 2008)", nos fue posible comprobar una amplia correlación de resultados. (60, 61, 62)

De acuerdo con Thoma *et al.*, que el modelo preclínico seleccionado para ejecutar este estudio, conejos, está bien documentado (Zellin & Linde 1999; Cochran *y col.* 2000; Stavropoulos *et al.* 2001; Mardas *y col.* 2003a, b, c; Hasegawa *y col.* 2008; Thoma *y col.* 2010; Donos *y col.* 2005), y tiene una buena aceptación desde un punto de vista ético, las translaciones de los resultados deben ser analizadas con prudencia, por ser un modelo animal con diferentes respuestas fisiológicas y de metabolismo, en comparación con los humanos. (29, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70)

Pero, si bien, el uso de animales pequeños, en este caso de conejos, difiere significativamente en comparación con los ensayos clínicos en humanos, este tipo de estudio se utiliza comúnmente como una "prueba de-principio" y nos aporta una buena idea acerca de lo que estamos comparando.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

El análisis de los resultados del presente trabajo, mediante estudio en vivo en animales y a través de dos técnicas de análisis, microtomografía de alta resolución y Histomorfometría, permite establecer:

En base a la Hipótesis de trabajo,

- Existen diferencias significativas de rendimiento en cuanto a calidad y cantidad de hueso nuevo formado debajo de las diferentes membranas estudiadas.
- Las diferencias significativas se verificaron en ambos procedimientos utilizados, tanto con la microtomografía de alta resolución como con los estudios histomorfométricos.
- En ambos ensayos se verificó un pobre rendimiento de la membrana de pericardio porcino y del grupo sin membrana, y mejores resultados en cuanto las membranas anmiocoriónica humanas, de fascia lata humanas, y de colágeno reconstituidas, en los 2 periodos de tiempo en que se realizó el estudio.

En relación a los estudios microtomográficos de alta resolución,

- Es un método de análisis válido para el estudio de la mineralización general en muestras diseccionadas.
- Es un método rápido y no destructivo de la muestra.

En relación a los resultados microtomográficos,

- Se observaron 2 subgrupos con diferencias estadísticas entre ellos, el primero constituido por la membrana de pericardio porcino y el grupo sin membrana agregada, que presentaron los menores valores de mineralización (sin diferencias estadísticas entre ambos).
- Se observó un segundo subgrupo, constituido por las membranas de fascia lata humana, anmiocoriónica humana y de colágeno reconstituido, que presentaron los mayores valores de mineralización (sin diferencias estadísticas entre ellas).
- Se observó la correlación de resultados en los 2 periodos de tiempo en que se realizó el estudio.

#### En relación a los estudios histomorfométricos

- Nos permiten diferenciar los diferentes tejidos que componen la muestra, cosa que la micro tomografía de alta resolución todavía no ha desarrollado la suficiente sensibilidad para hacerlo.
- Son estudios destructivos de la muestra. Si bien los preparados y los tacos son preservados, la muestra debe ser seccionada para el estudio.

#### En relación a los resultados histomorfométricos

- Se observaron 3 subgrupos con diferencias estadísticas entre ellos.
- Se observó un subgrupo constituido por la membrana de pericardio porcino y por el grupo sin membrana agregada (sin diferencia estadística entre ellos) que presentó los menores valores de neo formación ósea.
- Se observó un segundo subgrupo constituido por la membrana de fascia lata y anmiocoriónica humana (sin diferencia estadística entre ellos) que presentó valores medios de neo formación ósea.
- Se observó un tercer subgrupo constituido por la membrana de colágeno reconstituida que presentó los mejores valores de neo formación ósea.
- Se observó que los subgrupos permanecen inalterables cuando analizamos neo formación ósea más relleno agregado remanente.
- Se observó la correlación de resultados en los 2 periodos de tiempo en que se realizó el estudio.
- Se observó que, en todos los casos, independientemente de la membrana de barrera que se haya utilizado, la cantidad neta de tejido óseo formado es mayor en los casos donde no hay relleno óseo agregado (vacíos), que en sus contra partes con relleno (Bio-Oss), para el mismo periodo de tiempo.
- Se observó, que la arquitectura de reparación es muy superior en cuanto a la reparación tridimensional del defecto en los casos dónde hay relleno óseo agregado (Bio-Oss), que en sus contra partes sin rellenos (vacíos), para el mismo periodo de tiempo estudiado.
- Se analizó, qué la presencia de un relleno, que brinda una estructura de andamio para la formación del tejido óseo, también dificulta la neo formación, por obligar al organismo a crearlo de determinada forma y no como islotes que van creciendo y luego uniéndose (dinámica de curación ósea de la especie) además

del hecho de que el organismo tiene que disolver y fagocitar el injerto (mecanismo de degradación de los injertos óseos) ya que el nuevo hueso se va formando alrededor de las partículas de injerto y no como islotes independientes. Lo cual explica por qué la cantidad de tejido óseo neo formado resulta menor en los defectos con relleno agregado, pero se observa una disposición espacial del mismo tendiente a rellenar la totalidad del defecto generado.

Se destaca la validación de ambos métodos de estudio para este tipo de trabajo, microtomografía de alta resolución y Histomorfometría, y la correlación de resultados entre ambos.

## REFERENCIAS

**REFERENCIAS**

1. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005; 32:212-8.
2. Hardwick R, Scantlebury TV, Sánchez R, Whitley N, Ambruster J. Membrane design criteria for guided bone regeneration of de alveolar ridge. En: Buser D, Dahlin C, Schenk RK (eds.). *Guided bone regeneration in implant dentistry*. Chicago, Quintessence, 1994, pp. 101-36.
3. Boyne PJ. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. *J Am Dent Assoc* 1969; 78:767-76.
4. Tatakis DM, Promsudthi A, Wikesjö OM. Devises for periodontal regeneration. *Periodontol 2000* 1999; 19:59- 73.
5. Khojasteh A, Soheilifar S, Mohajerani H, Nowzari H. The effectiveness of barrier membranes on bone regeneration in localized bony defects. A systematic review. *JOMI* 2013; 4:1076-89.
6. Lorenzoni M, Pertl C, Polansky R, Wegscheider W. Guided bone regeneration with barrier membranes. A clinical and radiographic follow-up study after 24 months. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10:16-23.
7. Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen P, Barrier membranes: More than the barrier effect. *J Clin Periodontol*. 2019;46 (Suppl. 21):103–123.
8. Chiapasco M, et al, Bone Augmentation Procedures in Implant Dentistry. In *JOMI* 2009, 24 (suppl):237-259.
9. Ulrike K, et al, Horizontal Ridge Augmentation in Conjunction with or Prior to Implant Placement in the Anterior Maxilla: A Systematic Review, *JOMI* 2014; 29 (suppl): 14-24.
10. Hämmerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53:167-74.
11. Tal H, Moses O, Kozlovzky A, Nemcovsky C. Bioresorbable collagen membranes for guided bone regeneration. En: Tal H (ed.). *Bone regeneration*. InTechOpen Publisher, 2012.
12. Bornstein M., Von Arx T., Bosshardt D., 20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry, Edited by Daniel Buser, Quintessence Publishing Co, Inc.
13. Moses OI, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, et al. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol* 2008; 79:905-11.



14. Rothamel DI, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:369-78.
15. Calvo-Guirado JL, Garces M, Delgado-Ruiz RA, Ramírez Fernández MP, Ferres-Amat E, Romanos GE. Biphasic b-TCP mixed with silicon increases bone formation in critical site defects in rabbit calvaria. *Clin Oral Impl Res* 2015; 26:891-7.
16. Turri A, Dahlin C. Comparative maxillary bone-defect healing by calcium-sulphate or deproteinized bovine bone particles and extra cellular membranes in a guided bone regeneration setting: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2015; 26:501-6.
17. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *Journal of Neurosurgery* 1991; 74:487-91.
18. Bornstein M., Von Arx T., Bosshardt D., 20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry, Edited by Daniel Buser, Quintessence Publishing Co, Inc.
19. Delgado-Ruiz R, Romanos G, Alexandre S, Gómez-Moreno G, Maté-Sánchez de Val J, Calvo-Guirado J. Biological effects of compressive forces exerted on particulate bone grafts during socket preservation: animal study. *Clin Oral Impl Res* 2016; 0:1-10.
20. Hammerle CHF, Jung R. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontology 2000* 2003; 33:36-53.
21. Stavropoulos F, Dahlin C, Ruskin JD, Johansson C. A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. An experimental study in a canine model. *Clinical Oral Implants Research* 2004; 15:435-42.
22. Aloise AC, et al, Repair of Critical-Size Bone Defects Using Bone Marrow Stem Cells or Autogenous Bone With or Without Collagen Membrane: A Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria, *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30:208-215.
23. Thomaidis V, et al; Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defects beyond critical size. *Med Sci Monit*, 2008; 14(4):BR67-73.
24. Martínez A, Balboa O, Gasamans Xose I, Otero-Cepeda L, Guitian F. Deproteinized bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. *Clin Oral Impl Res* 2015; 26:623-632.
25. Colangelo P, et al; Bone regeneration guided by resorbable collagen membranes in rabbits: A pilot study. *Implant Dent*. 1993 SUM;2(2):101-5.
26. Rothamel D, et al; Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Jun;16(3):369-78.

27. Rastogi S<sup>1</sup>, Modi M, Sathian B.; The efficacy of collagen membrane as a biodegradable wound dressing material for surgical defects of oral mucosa: a prospective study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Aug;67(8):1600-6.
28. Hämmerle CH, et al; Ridge augmentation by applying bioresorbable membranes and deproteinized bovine bone mineral: a report of twelve consecutive cases. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Jan;19(1):19-25.
29. Stavropoulos A, et al; Clinical and histologic evaluation of a granular bovine bone biomaterial used as an adjunct to GTR with a bioresorbable bovine pericardium collagen membrane in the treatment of intrabony defects. *J Periodontol.* 2011 Mar;82(3):462-70.
30. Rothamel D; et al; Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of in vitro and in vivo examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants;* 2012 Jan-Feb 27(1): 146-54.
31. Niknejad H, et al; Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells and Materials* 2008, Vol.15:88-99.
32. Shaila V., et al; A clinical and radiological evaluation of DFDBA with amniotic membrane versus bovine derived xenograft with amniotic membrane in periodontal grade II furcation defects. Springer Science + Business Media B.V. 2009 Published online: 10 March 2009.
33. Trelford JD, et al; Implanted amniotic membrane as an autograft and as an allograft. *J Med.* 1975;6(2):169-80.
34. Kazakos K, et al; Application of PRP gel alone or in combination with guided bone regeneration does not enhance bone healing process: An experimental study in rabbits. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 39 (2011) 49-53
35. Sohn J Y, Park JC, Hum YJet al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci* 2010; 40; 180-187.
36. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, *et al.* AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2013, partes 1 y 2. *Laboratory Animals* 1996; 30:293-316.
37. Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. *Métodos de anestesia y analgesia en roedores y conejos.* 2011;1-10.
38. Pérez P.; Malano F.; Dedossi G.; Fernández Bodereau E.; Figueroa R.; Santibañez M.; Vedelago J, Valente, M. Ensayo estructural no destructivo utilizando microtomografía de rayos x para estimación de diferencias de densidad másica en muestras óseas de conejo. *Int. J. Morphol.*, 34(4):1232-1238, 2016.
39. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone regeneration materials. *J Craniofac Surg* 1988; 9; 310-316.

40. Guehenne LL, Goyenvalle E, Aguado E, et al. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 72; 69-78.
41. Bodde EW, Spauwen PHM, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85; 206-217.
42. Silva A, Oliveira M, Amaral L, Ferreira S, Garcia I, Mariano R, Effect of Doxycycline in Gel orm in Regeneration Bone: Histomorphometric and Tomographic Study in Rats Calvary, *Journal of Periodontology*; Copyright 2015 DOI: 10.1902/jop.2015.150343.
43. Sohn, J.Y., Park, J.C., Um, Y.J., Jung, U.W., Kim, C.S., Cho, K.S. & Choi, S.H. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 2010, 40: 180–187.
44. Kehl M, Swierkot, K, Mengel R. Three-Dimensional Measurement of Bone Loss at Implants in Patients with Periodontal Disease. *J Periodontol* 2011; 82; 689-99.
45. Jung RE, Fenner N, Hammerle CH, Zitzmann NU. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clinical Oral Implants Research* 2013; 24:1065-73.
46. Delgado-Ruiz R, Calvo Guirado J, Romanos G. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvaria. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Impl Res* 2015; 0:1-15.
47. Zins JE, Whitaker LA. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1983; 72:778-85.
48. Donos N, Mardas N, Chadha V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, spilt osteotomy). *Journal of Clinical Periodontology* 2008; 35:173-202.
49. Donos N, Lang NP, Karoussis IK, Bosshardt D, Tonetti M, Kostopoulos L. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical size defects. *Journal of Clinical Oral Implants Research* 2004; 15:101-11.
50. Sbordone C, Toti P, Guidetti F, Califano L, Santoro A, Sbordone L. Volume changes of iliac crest autogenous bone grafts after vertical and horizontal alveolar ridge augmentation of atrophic maxillas and mandibles: a 6-year computerized tomographic follow-up. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2012; 70:2559-65.
51. Zins JE, Whitaker LA. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1983; 72:778-85.
52. Ozaki W, Buchman S, Goldstein S, Fyhrie D. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1999; 104:139-47.

53. Ozkan E, Bereket M, DDS, Senel E, DDS, PhD, O'nger M, Effect of Electrohydraulic Extracorporeal Shockwave Therapy on the Repair of Bone Defects Grafted With Particulate Allografts, *J Craniofac Surg* 2019;30: 1298–1302.
54. Martini L, Giavaresi G, Fini M, et al. Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells. *Clin Orthop Relat Res* 2003: 269–280.
55. Esfahanizadeh N, Daneshpavar P, Takzaree N, Rezvan M, Daneshpavar N, Histologic Evaluation of the Bone Regeneration Capacities of Bio-Oss and MinerOss X in Rabbit Calvaria Defect, 2019 by Quintessence Publishing Co Inc.
56. Ulreich JB, Zuclich G, Lin HB, Li ST., Prediction of in Vivo Stability of a Resorbable, Reconstituted Type I Collagen Membrane by in Vitro Methods., 2000 Society World Biomaterials Congress Transactions, Sixth World Biomaterials Congress Transactions.
57. Yuen D, Junchaya C, Zuclich G, Ulreich J.B., Lin HB, Li ST., A Resorbable, Reconstituted Type I Collagen Membrane for Guided Tissue Regeneration and Soft Tissue Augmentation., *Society for Biomaterials*. 2000;1228.
58. Pripatnanont P, Praserttham P, Suttapreyasri S, Leepong N, Monmaturapoj N, Eng B, Eng M, Bone Regeneration Potential of Biphasic Nanocalcium Phosphate with High Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Ratios in Rabbit Calvarial Defects, *Int J Oral Maxillofac Implants* 2016;31:294–303. doi: 10.11607/jomi.4531.
59. Yip I, Ma L, Mattheos N, Dard M, Lang NP. Healing of calvaria defect with various bone substitutes. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2014, 1–9 doi: 10.1111/clr.12395.
60. Thoma DS, Lim H-C, Sapata VM, Yoon SR, Jung RE, Jung U-W. Recombinant bone morphogenetic protein-2 and platelet-derived growth factor-BB for localized bone regeneration. Histologic and radiographic outcomes of a rabbit study. *Clin. Oral Impl. Res.* 28, 2017, e236–e243 doi: 10.1111/clr.13002
61. Thimm, B.W., Wechsler, O., Bohner, M., Muller, R. € & Hofmann, S. (2013) In Vitro Ceramic Scaffold Mineralization: comparison Between Histological and Micro-Computed Tomographical Analysis. *Annals of Biomedical Engineering* 41: 2666–2675.
62. Gielkens, P.F., Schortinghuis, J., de Jong, J.R., Huysmans, M.C., Leeuwen, M.B., Raghoobar, G.M., Bos, R.R. & Stegenga, B. (2008) A comparison of micro-CT, microradiography and histomorphometry in bone research. *Archives of Oral Biology* 53: 558–566.
63. Cardaropoli D, Tamagnone L, Roffredo A, Gaveglia L, Cardaropoli G, DDS, Socket Preservation Using Bovine Bone Mineral and Collagen Membrane: A Randomized Controlled Clinical Trial with Histologic Analysis, *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 2012, 420-430.-
64. Zellin, G. & Linde, A. (1999) Bone neogenesis in domes made of expanded polytetrafluoroethylene: efficacy of rhBMP-2 to enhance the amount of achievable bone in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery* 103: 1229–1237.


65. Mardas, N., Kostopoulos, L., Stavropoulos, A. & Karring, T. (2003a) Denaturation of demineralized bone matrix significantly reduces bone formation by guided tissue regeneration. *Clinical Oral Implants Research* 14: 804–811.
66. Mardas, N., Kostopoulos, L., Stavropoulos, A. & Karring, T. (2003b) Evaluation of a cell-permeable barrier for guided tissue regeneration combined with demineralized bone matrix. *Clinical Oral Implants Research* 14: 812–818.
67. Mardas, N., Kostopoulos, L., Stavropoulos, A. & Karring, T. (2003c) Osteogenesis by guided tissue regeneration and demineralized bone matrix. *Journal of Clinical Periodontology* 30: 176–183.
68. Hasegawa, Y., Sato, S., Takayama, T., Murai, M., Suzuki, N. & Ito, K. (2008) Short-Term Effects of rhBMP-2-Enhanced Bone Augmentation Beyond the Skeletal Envelope Within a Titanium Cap in Rabbit Calvarium. *Journal of Periodontology* 79: 348–354.
69. Thoma, D.S., Jones, A., Yamashita, M., Edmunds, R., Nevins, M. & Cochran, D.L. (2010) Ridge Augmentation Using Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 Techniques: an Experimental Study in the Canine. *Journal of Periodontology* 81: 1829–1838.
70. Donos, N., Kostopoulos, L., Tonetti, M. & Karring, T. (2005) Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research* 16: 133–139.


# ANEXO

- Autorización del INTA para realizar el Proyecto en la EEA Paraná



## - Certificación del ABO por los inconvenientes ocasionados

 **UNC**  
Universidad Nacional de Córdoba

 1956 | 60 Aniversario  
2016 | de la FACULTAD  
de ODONTOLOGÍA

2017  
AÑO DE LAS  
ENERGÍAS RENOVABLES


Córdoba, 2 de Noviembre de 2017


Por la presente, se informa que con fecha de Noviembre de 2016 el *Od. Dedossi, Guillermo* ingresó muestras de su trabajo de Tesis Doctoral al Laboratorio de Histotecnología del Area de Biología Oral (Facultad de Odontología -UNC). Las mismas corresponden a tejido óseo y comenzaron a ser procesadas para su desmineralización; aunque dicho proceso se interrumpió por el cese de funciones del personal técnico de la sub-área, situación que se prolongó hasta Mayo de 2017, momento en que se incorporó una nueva histotecnóloga en el Laboratorio. El 23 de Agosto del corriente ocurrió un accidente, motivo por el cual el área se encuentra clausurada por la Justicia Federal, sin posibilidad de desarrollar actividades en el lugar.

Cabe aclarar que el proceso de desmineralización de grandes piezas de hueso lleva un período de tiempo aproximado de 2 a 6 meses, el cual fue interrumpido por los motivos arriba enunciados.

Con fecha 25 de Octubre de 2017 se le restituyeron personalmente las muestras al *Od. Dedossi, Guillermo* en su estado de procesamiento intermedio para que disponga de su tratamiento en otro laboratorio.

Se extiende la presente a los fines que hubiere lugar a los 15 días del mes de Diciembre de 2017.

  
Sebastián Fontana  
Responsable de Area  
Histotecnología-ABO

  
Liliána Bregains  
Responsable de Area  
Histotecnología-ABO