



ARTÍCULO CIENTÍFICO

Estudio Histomorfométrico de la regeneración ósea utilizando sulfato de calcio bifásico combinado con alendronato en conejos

Histomorfometric Study of the bone regeneration using bifasic calcium sulfate combined with alendronate in rabbits

Estudo Histomorfométrico da regeneração óssea utilizando sulfato de cálcio bifásico combinado com alendronato em coelhos

Catherine Tamayo Alcívar¹, Franklin Quel²

RECIBIDO: 20/jul/2017 ACEPTADO: 05/nov/2018 PUBLICADO: 31/dic/2018

1. Especialista en Implantología Oral, Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador. Docente de Prótesis Fija, Universidad San Gregorio de Portoviejo, Portoviejo-Ecuador.
2. PhD Laser en Dentística, Universidad de Sao Paulo-Brasil. Especialista en Cirugía Oral. Docente Posgrado de Implantología Oral, Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador.

CORRESPONDENCIA

Franklin Quel
Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial
Facultad de Odontología.
Universidad Central del Ecuador
fquelc@uce.edu.ec



RESUMEN

El alendronato es un bifosfonato con un amplio espectro de indicaciones cuya principal capacidad es la inhibición de la función osteoclástica. El sulfato de calcio bifásico es un injerto aloplástico que posee las ventajas del sulfato del calcio simple como biocompatibilidad, propiedades osteoconductoras y de bioreabsorción. **Objetivo:** Determinar la eficacia de la regeneración ósea a través de un estudio histomorfométrico utilizando sulfato de calcio bifásico sólo y combinado con Alendronato. **Materiales y métodos:** Se utilizaron 24 fémures de conejos machos andinos entre 1,5 a 2,5 Kg, divididos en 3 grupos: G1 Regeneración ósea fisiológica, G2 Sulfato de calcio bifásico y G3 Sulfato de calcio bifásico combinado con alendronato. Se realizó una incisión de 2,5cm para crear defectos de 5mm de diámetro con una profundidad de 1.5 mm. Todos los animales fueron sacrificados a la sexta semana y se obtuvieron cortes histomorfométricos. Fueron utilizados los test estadísticos de ANOVA y Tukey con un nivel de significancia del 5%. **Resultados:** La regeneración ósea fue del 10.63%, 40% y 71.88% para G1, G2 y G3 respectivamente. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0,001$). Se observó diferencia entre G1 y G3 ($p < 0,001$), así como entre el G2 y G3 ($p = 0,05$), siendo los mejores resultados encontrados para el G3. **Conclusión:** El sulfato de calcio bifásico combinado con alendronato mostró mejor regeneración ósea al compararlo con los grupos de regeneración fisiológica y sulfato de calcio en conejos.

Palabras clave: Regeneración ósea; Fémur, Sulfato de calcio; Alendronato; Bifosfonato.

ABSTRACT

Alendronate is a bisphosphonate with a broad spectrum of indications whose main capacity is the inhibition of osteoclastic function. Biphasic calcium sulfate is an alloplastic graft that possesses the advantages of simple calcium sulfate as biocompatibility, osteoconductive and bioreabsorption properties. **Objective:** To determine the efficacy of bone regeneration through a histomorphometric study using biphasic calcium sulfate alone and combined with Alendronate. **Materials and methods:** 24 femurs of Andean male rabbits were used between 1.5 and 2.5 Kg, divided into 3 groups: G1 Physiological bone regeneration, G2 Biphasic calcium sulphate and G3 Biphasic calcium sulphate combined with alendronate. An incision of 2.5 cm was made to create defects of 5 mm in diameter with a depth of 1.5 mm. All the animals were sacrificed at the sixth week and histomorphometric cuts were obtained. The statistical tests of ANOVA and Tukey with a level of significance of 5% were used. **Results:** Bone regeneration was observed in 10.63%, 40% and 71.88% for G1, G2 and G3 respectively. A statistically significant difference was found between the groups ($p < 0.001$). A difference was observed between G1 and G3 ($p < 0.001$), as well as between G2 and G3 ($p = 0.05$), being the best results found for the G3. **Conclusion:** Biphasic calcium sulphate combined with Alendronate showed better bone regeneration when compared to physiological regeneration and calcium sulfate groups in rabbits.

Keywords: Bone regeneration; Femur; Calcium sulfate; Alendronate; Bisphosphonate.

RESUMO

O alendronato é um bisfosfonato com amplo espectro de indicações cuja principal capacidade é a inibição da função osteoclástica. O sulfato de cálcio bifásico é um enxerto aloplástico que possui as vantagens do sulfato de cálcio simples como biocompatibilidade, osteocondutor e biorreabsorção. **Objetivo:** Determinar a eficácia da regeneração óssea através de estudo histomorfométrico utilizando sulfato de cálcio bifásico isolado e associado ao alendronato. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 24 fémures de coelhos machos andinos entre 1,5 e 2,5 kg, divididos em três grupos: G1 Regeneração óssea fisiológica, G2 Sulfato de cálcio bifásico e G3 Sulfato de cálcio bifásico combinado com alendronato. Uma incisão de 2,5 cm foi feita para criar defeitos de 5 mm de diâmetro com uma profundidade de 1,5 mm. Todos os animais foram sacrificados na sexta semana e foram obtidos cortes histomorfométricos. Os testes estatísticos de ANOVA e Tukey com nível de significância de 5% foram utilizados. **Resultados:** Regeneração óssea foi observada em 10,63%, 40% e 71,88% para G1, G2 e G3 respectivamente. Foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,001$). Observou-se diferença entre G1 e G3 ($p < 0,001$), assim como entre G2 e G3 ($p = 0,05$), sendo os melhores resultados encontrados para o G3. **Conclusão:** O sulfato de cálcio bifásico associado ao alendronato apresentou melhor regeneração óssea quando comparado aos grupos regeneração fisiológica e sulfato de cálcio em coelhos.

Palavras-chave: Regeneração óssea; Fêmur; Sulfato de cálcio; Alendronato; Bifosfonatos.



INTRODUCCIÓN

La reabsorción del hueso alveolar de los maxilares es el principal problema con el que el Cirujano maxilofacial se encuentra cuando requiere rehabilitar a un paciente edéntulo total o parcial y varias son las causas para provocar dicho proceso.¹⁻² La pérdida de la dentición natural da lugar a una reducción de la estimulación física del hueso alveolar, produciéndose una reabsorción ósea que es irreversible, crónica y acumulativa.³

La cantidad y calidad de hueso perdido después de una extracción se ve afectada por enfermedades sistémicas tales como: diabetes y osteoporosis y ellos podrían también presentar un nivel bajo de regeneración ósea, todo esto puede contribuir a niveles bajos en el éxito de la terapia con implantes,¹ de ahí la importancia de restaurar las condiciones de los tejidos duros y blandos en términos de morfología, calidad y cantidad, lograr una regeneración y una consolidación óseas de buena calidad y suprimir o limitar las consecuencias funcionales del defecto óseo.²⁻⁴

La regeneración ósea es la respuesta que consigue la restitución e integración del tejido tras un trauma, para ello existen procesos implicados en la neoformación ósea: Osteoinducción que es la transformación de células precursoras en células osteogénicas, posteriormente se produce la Osteogénesis: las células osteogénicas forman depósitos de matriz mineralizada y finalmente se forma una Osteoconducción que es la formación de hueso sobre la superficie de un andamio (matriz colágena fisiológica o el andamio implantado) al contrario de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido de cicatrización con características diferentes al original, es decir, el hueso es el único tejido del organismo con excepción del tejido embrionario, que se restaura totalmente tras una lesión.⁵⁻⁶

La regeneración ósea alveolar ha sido tema de estudio constante y se han creado durante muchos años distintos materiales para lograr la estabilidad del hueso alveolar después de extracciones dentarias. La última década se ha caracterizado por tener muchos avances tecnológicos y han dado lugar a una nueva era en el conocimiento de regeneración ósea, especialmente en diversas técnicas y con biomateriales de distinta procedencia, entre ellos los sustitutos óseos que son biomateriales o productos de ingeniería tisular, de origen humano, animal, vegetal o sintético, con la perspectiva de una reconstitución del tejido óseo, para el refuerzo de una estructura ósea o para el relleno de una pérdida de sustancia ósea de diferentes orígenes.⁴

El sulfato de calcio es un biomaterial aloplástico simple que presenta la más larga historia clínica como material sintético. Entre sus principales propiedades destacan que es de fácil obtención, capacidad de osteoconducción, es totalmente reabsorbible, no provoca reacciones inflamatorias o antigénicas, fácil modelado y fuerza de compresión semejante al tejido óseo, características necesarias para ser usado como sustituto óseo.⁷

El sulfato de calcio bifásico está diseñado para facilitar la manipulación y reducir el tiempo en los procedimientos de la regeneración ósea. Es un material con propiedades biocompatibles, osteoconductoras y bioreabsorbibles, sus propiedades físicas no se ven alteradas por la presencia de saliva o sangre, presenta una tasa de reabsorción comparable a la del crecimiento óseo natural y no interfiere en el proceso de cicatrización.⁸

INTRODUCTION

The reabsorption of the alveolar bone of the jaws is the principal problem with which the maxillofacial surgeon is when it requires rehabilitation of a total or partial edentulous patient and several are the causes to provoke this process.¹⁻² The loss of the natural dentition results in a reduction of the physical stimulation of the alveolar bone, producing a bone reabsorption that is irreversible, chronic and cumulative.³

The amount and quality of bone lost after an extraction is affected by systemic diseases such as: diabetes and osteoporosis and they may also present a low level of bone regeneration, all this may contribute to low levels in the success of implant therapy,¹ from there on the importance of restoring hard and soft tissue conditions in terms of morphology, quality and quantity, achieving good quality bone regeneration and consolidation and suppressing or limiting the functional consequences of the bone defect.²⁻⁴

Bone regeneration is the response that gets the tissue restitution and integration after a trauma, for this there are processes involved in bone neoformation: osteoinduction that is the transformation of precursor cells into osteogenic cells, then Osteogenesis occurs: osteogenic cells form deposits of mineralized matrix and finally an Osteoconduction is formed that is the formation of bone on the surface of a scaffold (collagen physiological matrix or the implanted scaffold) in contrast to the repair, where the tissue that is formed is a healing tissue with characteristics different from the original, that is, the bone is the only tissue of the organism with the exception of the embryonic tissue, which is completely restored after an injury.⁵⁻⁶

Alveolar bone regeneration has been the subject of constant study and different materials have been created for many years to achieve the stability of the alveolar bone after tooth extractions. The last decade has been characterized by many technological advances and has led to a new era in the knowledge of bone regeneration, especially in various techniques and biomaterials from different sources, including bone substitutes that are biomaterials or tissue engineering products, of human, animal, vegetable or synthetic origin, with the perspective of a reconstitution of the bone tissue, for the reinforcement of a bone structure or for the filling of a loss of bone substance of different origins.⁴

Calcium sulfate is a simple alloplastic biomaterial that has the longest clinical history as a synthetic material. Among its principal properties are that it is easy to obtain, osteoconduction capacity, is completely resorbable, does not cause inflammatory or antigenic reactions, easy modeling and compression force similar to bone tissue, characteristics necessary to be used as a bone substitute.⁷

Biphasic calcium sulfate is designed to facilitate handling and reduce time in bone regeneration procedures. It is a material with biocompatible, osteoconductive and bioreabsorbable properties, its physical properties are not altered by the presence of saliva or blood, it has a resorption rate comparable to that of natural bone growth and does not interfere with the healing process.⁸

Esto ha motivado a la búsqueda y el desarrollo de nuevos materiales y técnicas que optimicen el proceso de remodelación ósea, en este sentido es interesante conocer el uso de los bifosfonatos como biomoduladores de hueso en implantología, esto debido a la habilidad que tiene este fármaco de inhibir la actividad de los osteoclastos, la intención es que los bifosfonatos se transformen en una influencia positiva en el remodelado óseo.⁸

Los bifosfonatos se pueden utilizar de manera local ayudando a que no se reabsorba el hueso. Dentro de los bifosfonatos, el alendronato es un candidato para la aplicación terapéutica, ya que tiene una larga historia de uso clínico y es ampliamente aceptado en la comunidad médica para el tratamiento de la osteoporosis.¹⁰

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la eficacia de la regeneración ósea utilizando sulfato de calcio bifásico solo y combinado con Alendronato en conejos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio de tipo experimental contó con la aprobación del Comité de Ética de Investigación, de la Facultad de Odontología y de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Central del Ecuador.

Muestra

Se utilizaron 24 fémures de conejos andinos machos adultos con una edad entre 20 y 22 meses y con un peso entre 1,5-2,5 Kg, sanos. Los animales permanecieron en una Clínica cumpliendo con la normativa nacional e internacional sobre experimentación animal. Los fémures fueron divididos en 3 grupos 8 en cada uno: G1 regeneración ósea fisiológica, G2 con sulfato de calcio bifásico y G3 con sulfato de calcio bifásico combinado con alendronato.

En la presente investigación se utilizó 0,25cc de sulfato de calcio (CaS BondBone, MIS Implants Technologies Inc., Minden, Ibérica) en los grupos G2 y G3 mientras que la concentración de alendronato sódico (La Santé S. A. Bogotá, Colombia) fue de 2mg/ml para el grupo G3.

Técnica Quirúrgica

Luego de haber cuidado a los animales durante 1 mes, se inició con la experimentación, para ello los animales estuvieron previamente en ayunas durante un período de 6 horas posteriormente se realizó la inducción anestésica pre-quirúrgica con Atropina 0,1mg/kg (Laboratorios Sananderson S.A., Chile), anestesia quirúrgica con Xilazina 10% 1mg/kg (Rompun®, Bayer S.A., Ecuador), Ketamina 20-40mg/ml (Laboratorios Sananderson S.A., Chile), intramuscularmente y anestesia local con Lidocaína al 2% (Septodont Cedex, Francia), se procedió a afeitar la zona quirúrgica y a realizar la antisepsia con yodopovidona. Se efectuó un abordaje de 2,5cm de forma lateral longitudinal al eje de cada fémur, luego se realizó una ventana en la diáfisis del hueso con una trepana de 5.0mm de diámetro y cuya profundidad fue de 1,5mm con un motor NSK Surgic AP (Tokio, Japón) a 800 rpm con abundante irrigación de cloruro de sodio al 0.9%. Se creó un defecto óseo, fueron colocados los materiales en los grupos G2 y G3 (ver figura 1) y se procedió a cerrar la herida con hilos de sutu-

This has motivated the search and development of new materials and techniques that optimize the process of bone remodeling, in this sense it is interesting to know the use of bisphosphonates as bone biomodulators in implantology, this due to the ability of this drug to inhibit the activity of osteoclasts, the intention is that bisphosphonates become a positive influence on bone remodeling.⁸

Bisphosphonates can be used locally, helping to prevent the bone from being reabsorbed. Within bisphosphonates, alendronate is a candidate for therapeutic application, since it has a long history of clinical use and is widely accepted in the medical community for the treatment of osteoporosis.¹⁰

Therefore, the objective of the present study was to determine the efficacy of bone regeneration using biphasic calcium sulfate alone and combined with Alendronate in rabbits.

MATERIALS AND METHODS

The present experimental study was approved by the Research Ethics Committee, the Faculty of Dentistry and the Faculty of Veterinary Medicine of the Central University of Ecuador.

Sample

Twenty-four femurs of adult male Andean rabbits with an age between 20 and 22 months and weighing between 1.5-2.5 Kg were used, healthy. The animals remained in a Clinic complying with the national and international regulations on animal experimentation. The femurs were divided into 3 groups 8 in each: G1 physiological bone regeneration, G2 with biphasic calcium sulfate and G3 with biphasic calcium sulfate combined with alendronate.

In the present investigation 0.25cc of calcium sulfate (CaS Bond Bone, IT Implants Technologies Inc., Minden, Iberian) was used in groups G2 and G3 while the concentration of alendronate sodium (La Santé SA Bogotá, Colombia.) Was of 2mg / ml for the G3 group.

Surgical Technique

After caring for the animals for 1 month, the experimentation began, for which the animals were previously fasted for a period of 6 hours, then the pre-surgical anesthetic induction was performed with Atropine 0.1mg / kg (Sananderson Laboratories SA, Chile), surgical anesthesia with Xylazine 10% 1mg / kg (Rompun®, Bayer SA, Ecuador), Ketamine 20-40mg / ml (Sananderson Laboratories SA, Chile), intramuscularly and local anesthesia with 2% Lidocaine (Septodont Cedex, France), We proceeded to shave the surgical area and perform the antisepsis with iodopovidone. A 2.5cm laterally longitudinal approach to the axis of each femur was performed, then a window was made in the diaphysis of the bone with a trephine of 5.0mm of diameter whose depth was 1.5mm with an NSK Surgic AP motor (Tokyo, Japan) at 800 rpm with abundant 0.9% sodium chloride irrigation. A bone defect was created, the materials were placed in groups G2 and G3 (see figure 1) and the wound was closed with suture threads in two planes. (Vicryl 5.0-Silk 4.0). For post-operative care, injectable antibiotic penicillin plus Streptomycin 1ml was administered



ra en dos planos. (Vicryl 5.0-Seda 4.0). Para los cuidados post-operatorios se administró antibiótico inyectable penicilina más Streptomina 1ml cada 10-20Kg (IM, Shotapen L.A., Laboratorios Virbac, Ecuador) y ketoprofeno 0.1ml/Kg (GenetiaPharmactive S.A., Ecuador) por 5 días. Luego de la intervención estuvieron en jaulas individuales a una temperatura ambiente de 22-30°C y fueron alimentados con comida balanceada para conejos (150-200g/día) y con agua a demanda. Luego de haber transcurrido 6 semanas se sacrificaron a los animales previa sedación con pentobarbital sódico 100 mg/kg (Euthanex®, INVET, Colombia) intracardiaca, posteriormente se realizó la desarticulación del fémur se separaron los tejidos blandos y se realizó el corte del bloque regenerado.

every 10-20Kg (IM, Shotapen L.A., Virbac Laboratories, Ecuador) and ketoprofen 0.1ml / Kg (Genetia Pharmactive S.A., Ecuador) for 5 days. After the intervention they were in individual cages at an ambient temperature of 22-30°C and were fed with balanced feed for rabbits (150-200g / day) and with water on demand. After 6 weeks had elapsed, the animals were sacrificed after sedation with pentobarbital sodium 100 mg / kg (Euthanex®, INVET, Colombia) intracardiac, then the dismantling of the femur was performed, the soft tissues were separated and the regenerated block was cut.

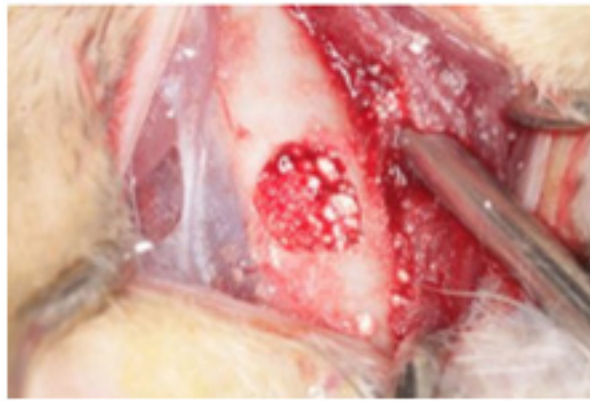


Figura 1: Defecto óseo previa la colocación de sulfato de calcio bifásico y alendronato

Figure 1: Bone defect after placement of biphasic calcium sulfate and alendronate

Estudio Histomorfométrico

El bloque de hueso fue fijado en formol bufferado al 10% por 24 horas en envases estériles, las muestras fueron procesadas en el equipo Leica ASP300; las fijaciones se realizaron con hematoxilina y eosina; y posteriormente se analizaron las muestras en el microscopio óptico OLYMPUS BX53 (Tokio, Japón) con cámara OLYMPUS DP73 cuyo programa fue CellSens Estándar Olympus, cuya medición fue realizada de acuerdo al área de la fractura y espesor contabilizando los osteoblastos por campo de 20x en cada conducto de Havers.

Histomorphometric Study

The bone block was fixed in 10% buffered formalin for 24 hours in sterile containers, the samples were processed in the Leica ASP300 equipment; fixations were made with hematoxylin and eosin; and then the samples were analyzed in the OLYMPUS BX53 optical microscope (Tokyo, Japan) with OLYMPUS DP73 camera whose program was Olympus Standard CellSens, whose measurement was made according to the area of the fracture and thickness accounting for the osteoblasts per 20x field in each Havers conduit.

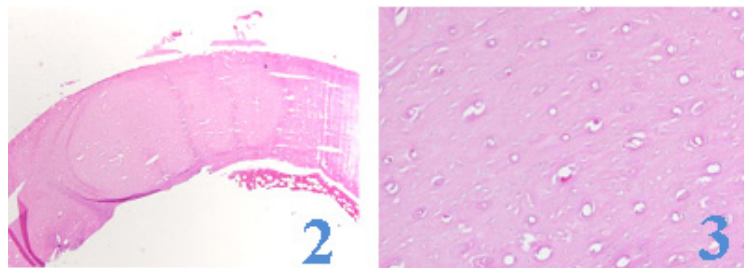


Figura 2, 3: Corte histológico - Técnica hematoxilina-eosina. Magnificación 4x-40x. Defecto óseo creado en conejo a las 6 semanas. Regeneración ósea fisiológica.

Figure 2, 3: Histological section - Hematoxylin-eosin technique. Magnification 4x-40x. Bone defect created in rabbit at 6 weeks. Physiological bone regeneration.

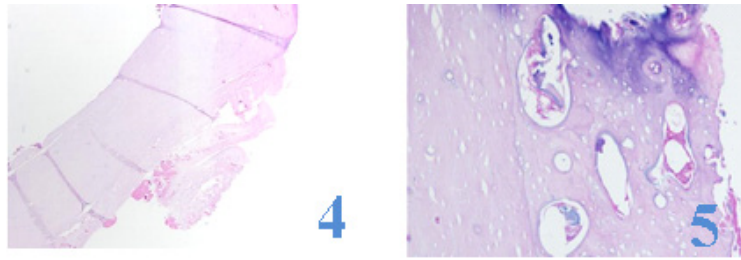


Figura 4 y 5: Corte histológico - Técnica hematoxilina-eosina. Magnificación 4x-40x. Defecto óseo creado en conejo a las 6 semanas. Regeneración ósea con sulfato de calcio.

Figure 4 and 5: Histological section - Hematoxylin-eosin technique. Magnification 4x-40x. Bone defect created in rabbit at 6 weeks. Bone regeneration with calcium sulfate.

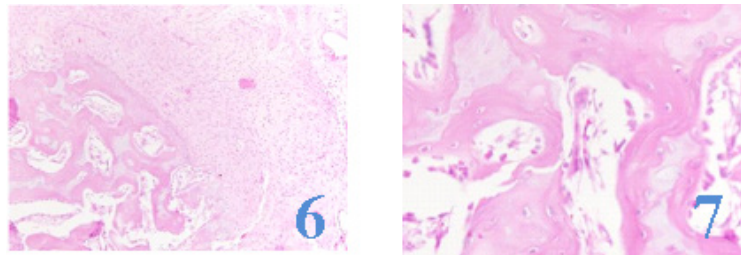


Figura 6 Y 7: Corte histológico - Técnica hematoxilina-eosina. Magnificación 4x-40x. Defecto óseo creado en conejo a las 6 semanas, se observa gran cantidad de formación de osteoblastos. Regeneración ósea con sulfato de calcio combinado con alendronato.

Figure 6 and 7: Histological section - Hematoxylin-eosin technique. Magnification 4x-40x. Bone defect created in rabbit at 6 weeks, a large amount of osteoblast formation is observed. Bone regeneration with calcium sulfate combined with alendronate.

Análisis Estadístico

Los datos fueron transportados en el programa de Microsoft Excel y procesados con el programa SPSS 22. Fue utilizado el análisis estadístico ANOVA y Test de Tukey con un nivel de significancia de 5%.

Statistical analysis

The data were transported in the Microsoft Excel program and processed with the SPSS 22 program. The statistical analysis ANOVA and Tukey Test with a level of significance of 5% was used.

Tabla 1: Medias y desviaciones estándar de la regeneración ósea obtenida de cada grupo de estudio

GRUPOS	N	Media	95% del intervalo de confianza para la media		Desviación estándar
			Límite inferior	Límite superior	
GRUPO 1: Regeneración Ósea Fisiológica	8	10.63%	0.04%	21.21%	12.66
GRUPO 2: Regeneración Ósea con sulfato de calcio	8	40.00%	10.61%	69.39%	35.15
GRUPO 3: Regeneración Ósea con sulfato de calcio y alendronato	8	71.88%	52.79%	90.39%	22.83



Table 1: Averages and standard deviations of bone regeneration obtained from each study group

GROUPS	N	Mean	95% confidence interval for the mean		Standar deviation
			Lower limit	Upper limit	
GROUP 1: Bone Physiologi- cal Regeneration	8	10.63%	0.04%	21.21%	12.66
GROUP 2: Bone regenera- tion with calcium sulfate	8	40.00%	10.61%	69.39%	35.15
GROUP 3: Bone regenera- tion with calcium sulfate and alen- dronate	8	71.88%	52.79%	90.39%	22.83

La regeneración ósea observada fue de 10,63%, 40,0% y de 71,88%, para los grupos G1, G2 y G3 respectivamente. (ver tabla 1). Siendo el G3 el que mejor eficacia de regenerativa ósea demostró.

The bone regeneration observed was 10.63%, 40.0% and 71.88%, for the groups G1, G2 and G3 respectively. (see table 1). Being the G3 the one that better efficiency of regenerative bone demonstrated.

Tabla 2: Prueba de ANOVA para comprobar la diferencia de regeneración ósea de los grupos de estudio

Regeneración		
	Media cuadrática	
Entre grupos	0,751	<0,001
Dentro de grupos	0,064	

Table 2: ANOVA test to check the difference of bone regeneration of the study groups

Regeneration		
	Quadratic Mean	
Between groups	0,751	<0,001
Within Groups	0,064	

Tabla 3: Test de Tukey de los diferentes grupos de estudio

Comparaciones Múltiples			
(I) GRUPOS	(J) GRUPOS	Diferencia de medias (I-J)	P
GRUPO 1: Rege- neración Ósea Fi- siológica	GRUPO 2: Rege- neración Ósea con sulfato de calcio	-0,294	0,074
	GRUPO 3: Rege- neración Ósea con sulfato de calcio y alendronato	-0,613	<0,001
GRUPO 2: Rege- neración Ósea con sulfato de calcio	GRUPO 3: Rege- neración Ósea con sulfato de calcio y alendronato	-0,319	0,050

Table 3: Tukey test of the different study groups

Multiple Comparisons			
(I) GROUPS	(J) GROUPS	Diferencia de medias (I-J)	P
GROUP 1: Bone Physiological Regeneration	GROUP 2: Bone regeneration with calcium sulfate	-0,294	0,074
	GROUP 3: Bone regeneration with calcium sulfate and alendronate	-0,613	<0,001
GROUP 2: Bone regeneration with calcium sulfate	GROUP 3: Bone regeneration with calcium sulfate and alendronate	-0,319	0,050

No existe diferencia entre G1 y G2, el G3 es el que tiene mayores valores de regeneración ósea siendo estadísticamente significativo comparados con el G1 y G2.

There is no difference between G1 and G2, G3 is the one with the highest bone regeneration values, being statistically significant compared to G1 and G2.

DISCUSIÓN

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción durante toda la vida, que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. Este fenómeno equilibrado denominado proceso de remodelado, consta de diferentes fases: Fase quiescente, fase de activación, fase de reabsorción, fase de formación y fase de mineralización; los bifosfonatos actúan en la fase reabsorción inhibiendo a los osteoclastos y de esta forma evitando la reabsorción ósea.⁹ El propósito de este estudio fue determinar la eficacia de la regeneración ósea utilizando sulfato de calcio y sulfato de calcio combinado con Alendronato, demostrando así que la regeneración ósea fue mejor en el grupo G3 que en el grupo G1 y el G2 a las seis semanas, concordando con diferentes estudios,¹¹⁻¹⁴ concluyendo que la aplicación local de bifosfonatos mejora los tiempos de regeneración ósea, como se observó en el grupo G3. Aspenberg & Astrand, 2002¹⁵, demostraron que el tratamiento con bifosfonatos locales puede proteger el injerto de la reabsorción ósea durante el período posoperatorio temprano; Rogers, 2003¹⁶ por otra parte manifiesta que el alendronato aumenta la formación ósea mediante la inhibición de la remodelación mediada por los osteoclastos. Como fue observado en el presente estudio en que el bifosfonato combinado con alendronato mostró mejor regeneración ósea.

Omi et al., 2007¹⁷, estudió en tibias de conejos Japoneses blancos comparando dos vías de administración del alendronato, sistémica y local, demostrando que con la aplicación local se obtienen mejores resultados tanto en la formación de hueso como en la disminución de la reabsorción ósea, probablemente porque el alendronato es captado directamente por los osteoclastos, resultados similares a los que se encontraron en el presente estudio en donde se observó mejor regeneración ósea en los conejos andinos donde fue asociado el alendronato con el sulfato de calcio.

DISCUSSION

The bone is a dynamic tissue in constant formation and resorption throughout life, which allows the maintenance of bone volume, repair of tissue damage and homeostasis of phosphocalcic metabolism. This balanced phenomenon called the remodeling process, consists of different phases: quiescent phase, activation phase, reabsorption phase, formation phase and mineralization phase; the bisphosphonates act in the reabsorption phase inhibiting osteoclasts and thus avoiding bone resorption.⁹ The purpose of this study was to determine the efficacy of bone regeneration using calcium sulfate and calcium sulphate combined with Alendronate, thus demonstrating that bone regeneration was better in the G3 group than in the G1 group and G2 at the six weeks, agreeing with different studies,¹¹⁻¹⁴ concluding that the local application of bisphosphonates improves the bone regeneration times, as observed in the G3 group. Aspenberg & Astrand, 2002¹⁵, demonstrated that treatment with local bisphosphonates can protect the graft from bone resorption during the early postoperative period; Rogers, 2003¹⁶, on the other hand, states that alendronate increases bone formation by inhibiting osteoclast-mediated remodeling. As observed in the present study, the bisphosphonate combined with alendronate showed better bone regeneration.

Omi et al., 2007¹⁷, studied in tibias of white Japanese rabbits comparing two administration routes of alendronate, systemic and local, demonstrating that with the local application better results are obtained both in bone formation and in the reduction of Bone resorption, probably alendronate is directly taken up by osteoclasts, results similar to those found in the present study where better bone regeneration was observed in Andean rabbits where alendronate was associated with calcium sulfate.



Cabe recalcar que para este estudio se utilizó 2mg/ml de alendronato, este tema es muy controversial puesto que de ello depende el éxito de la regeneración ósea; Moreno-Moreno et al., 2016¹⁸, en su estudio reportaron que los bifosfonatos no nitrogenados requieren de concentraciones más altas para alcanzar efectividad en la inhibición osteoclástica, por el contrario los bisfosfonatos nitrogenados en concentraciones menores llegan a cumplir con esta función; sin embargo la dosificación sigue siendo un tema muy discutido; en un revisión de Mathijssen et al., 2014¹⁹, sobre la combinación de bifosfonatos con aloinjertos para la colocación de implantes, se habla de forma general de la dosificación de los bifosfonatos, concluyendo que los 2mg/ml de Alendronato incrementan la formación ósea evitando de esta manera efectos perjudiciales en la fisiología del osteoblasto, concordando con los resultados de Jakobsen et al., 2010²⁰, en su estudio realizado en perros.

La efectividad de regeneración ósea en el grupo de sulfato de calcio combinado con alendronato obtuvo resultados estadísticamente significativos en nuestro estudio, no hay en la literatura estudios sobre el sulfato de calcio combinado con alendronato como biomaterial utilizado en la regeneración ósea, en esta investigación no se encontró restos de alendronato ni de sulfato de calcio a las 6 semanas. Recordemos que sólo hemos utilizado un tipo de bifosfonato y una sola dosis a un solo tiempo por tanto es necesario futuras investigaciones sobre este tema.

CONCLUSIÓN

La regeneración ósea utilizando sulfato de calcio bifásico combinado con Alendronato en conejos mostró ser mayormente eficaz que la regeneración realizada con sulfato de calcio bifásico solo y la regeneración fisiológica.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a los profesores de la FO-UCE en especial a los Dres. Kleber Vallejo, Gustavo Tello y Eduardo Garrido por su valiosa contribución en el desarrollo del presente trabajo de investigación. A los Doctores: José Jaramillo Reinoso (Veterinario), Wellington Octavio Reyes Sillagona (Veterinario), Francisco Estrella Vásquez (Patólogo) y Johanna Cevallos Espinel (Patóloga), así como, a los Ing. Edwin Galindo (Estadístico), Ing. Químico Richard Tamayo Alcivar y al Químico Farmacéutico Luis Alberto Toala Murillo por las contribuciones para el desarrollo de la presente investigación.

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Di Stefano DA, Cazzaniga A. Injertos Óseos en las reconstrucciones pre y periimplantares. 1era. ed. Caracas Venezuela: Edit. AMOLCA; 2013; p.7
2. Chiapasco M, Gatti C, Casentini P, Procopio C. Manual ilustrado de Implantología Oral. 1era. ed. Madrid España: Edit. AMOLCA.; 2010; p. 291-92
3. Raspall G. Cirugía Oral e Implantológica. 2da. ed. Madrid España: Edit. Médica Panamericana; 2006; p. 214

It should be noted that 2mg / ml of alendronate was used for this study, this topic is very controversial since the success of bone regeneration depends on it; Moreno-Moreno et al., 2016¹⁸, in their study reported that non-nitrogenous bisphosphonates require higher concentrations to achieve effectiveness in osteoclastic inhibition; on the contrary, nitrogenous bisphosphonates in lower concentrations achieve this function; however, dosing is still a very controversial topic; in a review by Mathijssen et al., 2014¹⁹, on the combination of bisphosphonates with allografts for implant placement, the dosage of bisphosphonates is generally discussed, concluding that the 2mg / ml of Alendronate increases the formation Bone thus avoiding harmful effects in the osteoblast physiology, agreeing with the results of Jakobsen et. al., 2010²⁰, in his study conducted on dogs.

The effectiveness of bone regeneration in the group of calcium sulfate combined with alendronate obtained statistically significant results in our study, there are no studies in the literature on calcium sulfate combined with alendronate as a biomaterial used in bone regeneration, in this research it was not found remnants of alendronate or calcium sulfate at 6 weeks. Remember that we have only used one type of bisphosphonate and a single dose at a single time therefore future research on this subject is necessary.

CONCLUSION

Bone regeneration using biphasic calcium sulphate combined with Alendronate in rabbits was shown to be more effective than regeneration performed with biphasic calcium sulfate alone and physiological regeneration.

ACKNOWLEDGE

I thank the professors of the DS-CUE, especially Drs. Kleber Vallejo, Gustavo Tello and Eduardo Garrido for their valuable contribution in the development of this research work. To the Doctors: José Jaramillo Reinoso (Veterinarian), Wellington Octavio Reyes Sillagona (Veterinarian), Francisco Estrella Vasquez (Pathologist) and Johanna Cevallos Espinel (Pathologist), as well as Eng. Edwin Galindo (Statistician), Chemical Engineer Richard Tamayo Alcivar and the Pharmaceutical Chemist Luis Alberto Toala Murillo for the contributions for the development of the present investigation.

4. Mainard D. Sustitutos óseos. Aparato locomotor. EMC. 2014; 2(47): 1 - 11.
5. Suarez D, Hosseini MM, Principios básicos en regeneración ósea guiada. Acta Bioclínica. 2012 2(3): 1-28.
6. Fernández T, Hernández GI, Alobera MA, del Canto Pingarrón M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11: 47-51
7. López J, Alarcón M. Sulfato de calcio: propiedades y aplicaciones clínicas. Revisión Bibliográfica. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. 2011; 4(3):138 - 43.

8. MIS Implants Technologies Ltd., n.d., Junio-2018. A través de: Google Académico. Disponible en: http://misiberica.es/wp-content/uploads/2018/06/MIS_Soluciones_Regenerativas.pdf.
9. Fernández T, Hernández GI, Alobera GMA, del Canto Pingarrón M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11: 151-7.
10. Guimaraes M, Bueno R, Blaya M, Shinkai R, Marquez L. Influence of the local application of sodium alendronate gel on osseointegration of titanium implants. *Oral & Maxillofacial Surgery*. 2015; 1(44):1423-9.
11. Bobyn JD, Thompson R, Lim L, Pura JA, Bobyn K, Tanzer M. Local alendronate elution increases net periimplant bone formation: a micro-CT analysis. *Clin Orthop Relat Res* 2014; 472: 687-94.
12. Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, Guicheux J, Zambelli PY, Bouler JM, Gauthier O. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone*. 2005; 36(1): 52-60.
13. Harmankaya N, Karlsson J, Palmquist A, Halvarsson M, Igawa K, Anderson M, Tengvall P. Raloxifene and alendronate containing thin mesoporous titanium oxide films improve implant fixation to bone. *Acta biomater*. 2013; 9(6): 7064-73
14. Lee SJ, Oh TJ, Bae TS, Lee MH, Sho Y, Kim Bi, Kim HS. Effect of bisphosphonates on anodized and head-treated titanium surfaces: an animal experimental study. *J Periodontal*. 2011; 82(7):1035-42
15. Aspenberg P, Astrand J. Bone allografts pretreated with a bisphosphonate are not resorbed. *Acta Orthop Scand*. 2002; 73(1): 20-23.
16. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Current Pharmaceutical Design*. 2003;(9): 2643 - 58.
17. Omi H, Kusumi T, Kijima H, Toh S. Locally administered low-dose alendronate increases bone mineral density during distraction osteogenesis in a rabbit model. *Bone Joint Surg*. 2007;(89): 984 - 88.
18. Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, Bertos E, Reyes C, García O, Ruiz C. Nitrogen-containing bisphosphonates modulate the antigenic profile and inhibit the maturation and biomineralization potential of osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig*. 2015; 19: 895-902.
19. Mathijssen N, Buma P, Hannink G. Combining bisphosphonates with allograft bone for implant. *Cell Tissue Bank*. 2014; 329 - 36.
20. Jakobsen T, Baas J, Bechtold JE, Elmengaard B, Soballe K. The effect of soaking allograft in bisphosphonate. A pilot dose response study. *Clin Orthop Relat Res*. 2010; 468(3): 867-74

CITE ESTE ARTÍCULO COMO / CITE THIS ARTICLE AS

Tamayo-Alcívar C, Quel C Franklin E. Estudio Histomorfométrico de la regeneración ósea utilizando sulfato de calcio bifásico combinado con alendronato en conejos. *Odontología*. 2018; 20(2):29-38. <http://dx.doi.org/10.29166/odontologia.vol20.n2.2018-29-38>