



Parámetros histológicos de la regeneración ósea guiada con hidroxiapatita FOULA en ratas BIOU: Wistar

Vanessa Pineda,* Oriana Olivares,* Jenair Yépez,[§] Anajulia González^{||}

* Odontólogo egresado de la Universidad de Los Andes. Facultad de Odontología.

[§] Universidad de Los Andes. Facultad de Odontología. Cátedra de Cirugía Bucal.

^{||} Universidad de Los Andes. Facultad de Odontología. Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO).

Universidad de los Andes (ULA), Mérida-Venezuela.

RESUMEN

La regeneración ósea guiada es un procedimiento que induce la regeneración de defectos óseos usando biomateriales tales como la hidroxiapatita, concentrados plaquetarios, hueso liofilizado, etcétera. En la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (FOULA) se sintetizó un biomaterial a base de hidroxiapatita, cuya eficacia no ha sido evaluada. **Objetivo:** Determinar la efectividad de la hidroxiapatita FOULA en el proceso de regeneración ósea guiada en defectos óseos creados en tibias de ratas BIOU: Wistar. **Metodología:** Se seleccionaron 33 ratas macho (cepa BIOU: Wistar). Se creó un defecto óseo en ambas tibias traseras, la tibia derecha alojó el biomaterial, dejando la izquierda libre del mismo. Se formaron dos grupos experimentales de 15 animales por tipo de hidroxiapatita (FOULA y Coralina); éstos se dividieron en subgrupos de cinco animales, de acuerdo al tiempo de estudio (tres, seis y nueve semanas). Los datos se evaluaron histopatológicamente. **Resultados:** A las 3 semanas, los niveles alcanzados fueron nivel III de RO (HA-FOULA) y nivel II (HA-Coralina). No obstante, a las 6 y 9 semanas el porcentaje de RO aumentó a nivel IV, usando HA-Coralina. Sin embargo, estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre los grupos. **Conclusión:** Desde el punto de vista histopatológico, la HA-FOULA resultó eficaz en el proceso de regeneración ósea en defectos creados en tibias de ratas BIOU: Wistar.

Palabras clave: Hidroxiapatita, biomaterial, defecto óseo, regeneración ósea, BIOU: Wistar.

INTRODUCCIÓN

En la práctica odontológica, uno de los retos que se presentan es la reposición de tejidos duros que se han perdido por lesiones, patologías o procedimientos quirúrgicos. Es por esto que la utilización de diferentes métodos regenerativos en defectos óseos ha sido un tema ampliamente estudiado en los últimos años, centrándose en la creación de nuevo hueso en las diferentes zonas que sean necesarias.^{1,2}

La regeneración ósea guiada (ROG) es un procedimiento terapéutico que consiste en inducir la regeneración de defectos óseos, más no la cicatrización.³ Se fundamenta en la utilización de sistemas de barreras mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo, se excluyen células provenientes del epitelio gingival y tejido conectivo que puedan interferir con el

potencial osteogénico del tejido óseo correspondiente a la zona del defecto.¹ Es una técnica predecible y efectiva cuando se realiza previo análisis del caso.⁴ Para la aplicación de esta técnica son necesarios materiales que cumplan ciertos requisitos, tales como biocompatibilidad, oclusividad celular, generación de espacio, integración a los tejidos, fácil manipulación y que permanezcan el tiempo suficiente para permitir la proliferación celular.⁵

La hidroxiapatita (HA) es un biocristal formado por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno, que funciona como material osteoconductor, y tiene alta biocompatibilidad y bioafinidad con los tejidos vivos. Hoy en día se considera el biomaterial más utilizado en ROG, debido a que representa junto con el colágeno tipo I, uno de los principales componentes del hueso. La HA no posee propiedades osteogénicas, ya que no estimula la formación de nuevo hueso; sin embargo, tiene propiedades osteoconductoras, ya que provee una matriz favorable para el depósito constante de nuevo hueso, debido a la capacidad de establecer intercambios químicos y de formar enlaces con el tejido vivo.⁶⁻¹⁰ Este material puede obtenerse por diversos métodos, entre los cuales se encuentra la precipitación química, que consiste principalmente en añadir una solución fosfataada a otra con iones de Ca^{++} en condiciones controladas. Las de origen cerámico están constituidas por partículas esféricas de alta densidad y gran pureza, se obtienen por calentamiento de los fosfatos cálcicos amorfos. El medio utilizado y las temperaturas a las que se elabora este tipo de hidroxiapatita son los

Recibido: Febrero 2019. Aceptado: Agosto 2019.

© 2019 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



factores determinantes de la estructura cristalina del material, así como la porosidad y la solubilidad; mientras que de manera natural, la HA se puede obtener de tres seres vivos: bovinos, corales y algas.⁶

La HA FOULA fue probada con anterioridad de manera *in vitro*, cumpliendo con la fase I y II durante un ensayo biológico *in vitro*. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios *in vivo* mediante ensayos preclínicos en animales de experimentación con la finalidad de constatar su efectividad, prevenir y controlar posibles efectos tóxicos, además de evaluar la relación riesgo-beneficio de la misma; razón por la cual el objetivo de esta investigación fue determinar los parámetros histopatológicos en el proceso de regeneración ósea guiada en defectos óseos creados en tibias de ratas BIOU: Wistar.

METODOLOGÍA

Cumpliendo con los lineamientos del Código de Bioética y Bioseguridad, y contando con la aprobación

del presente estudio en animales de experimentación por parte de la Comisión de Bioética del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA) se seleccionaron 33 ratas macho adultas, de la cepa BIOU: Wistar, con un peso promedio entre 300-450 g. Se formaron dos grupos experimentales (15 animales en cada uno) para cada tipo de HA (FOULA y CORALINA); a su vez estos grupos se dividieron en subgrupos (cinco animales en cada uno), dependiendo del tiempo de sacrificio (tres, seis y nueve semanas); tres animales representaron el grupo control-control, con la finalidad de evaluar que los parámetros ambientales no influyeran con el desarrollo y resultado del estudio.

Procedimiento quirúrgico

Al inicio los animales fueron sedados con una inyección de 0.7 cm³ aproximadamente de una solución de ketamina (100 mg/kg), en asociación con xilacina (5 mg/kg) vía intraperitoneal, se probó el estado de sedación mediante punción en cola y patas para pro-

Fase quirúrgica *Surgical phase*

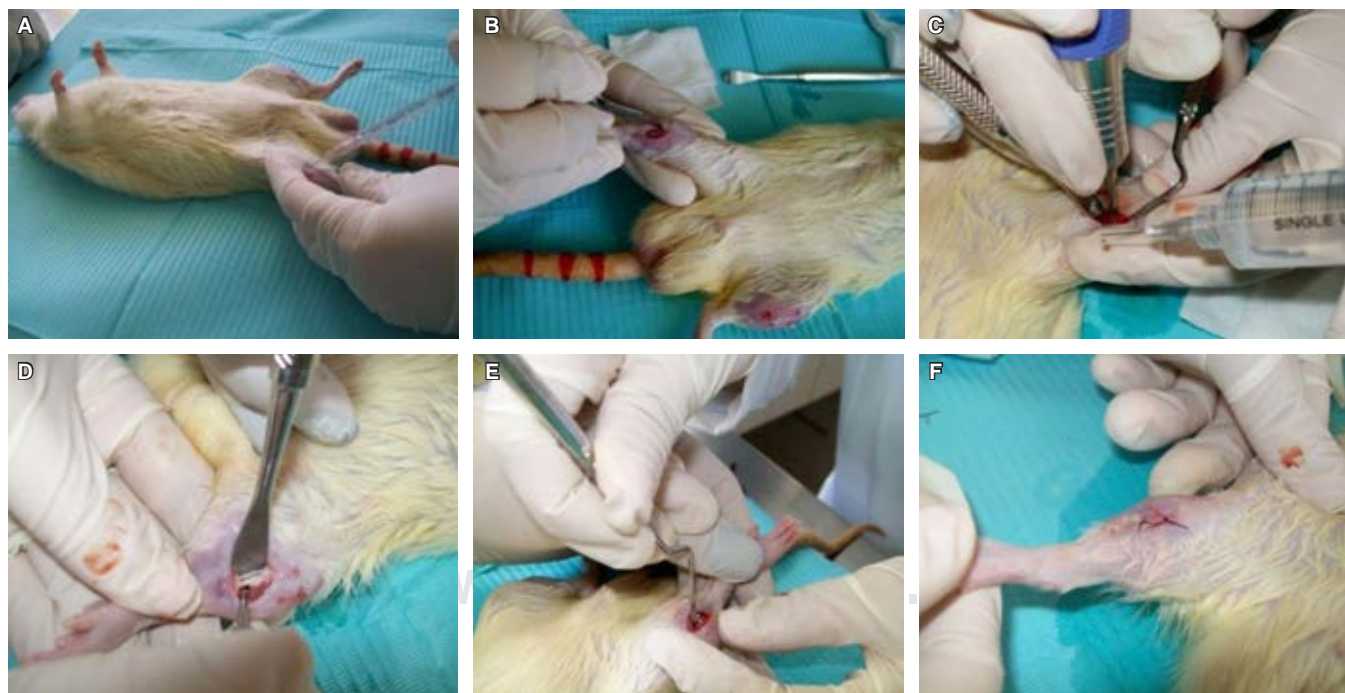


Figura 1: Procedimiento quirúrgico. **A)** Anestesia. **B)** Incisión. **C)** Creación del defecto óseo. **D)** Defecto creado. **E)** Implantación del biomaterial correspondiente dentro del mismo. **F)** Sutura en plano muscular y cutáneo.

Fuente propia.

Surgical procedure: A) anesthesia, B) incision, C) creation of bone defect, D) created bone defect, E) Implantation of the corresponding biomaterial, F) Suture of muscular and cutaneous layers.

Source: Own elaboration.

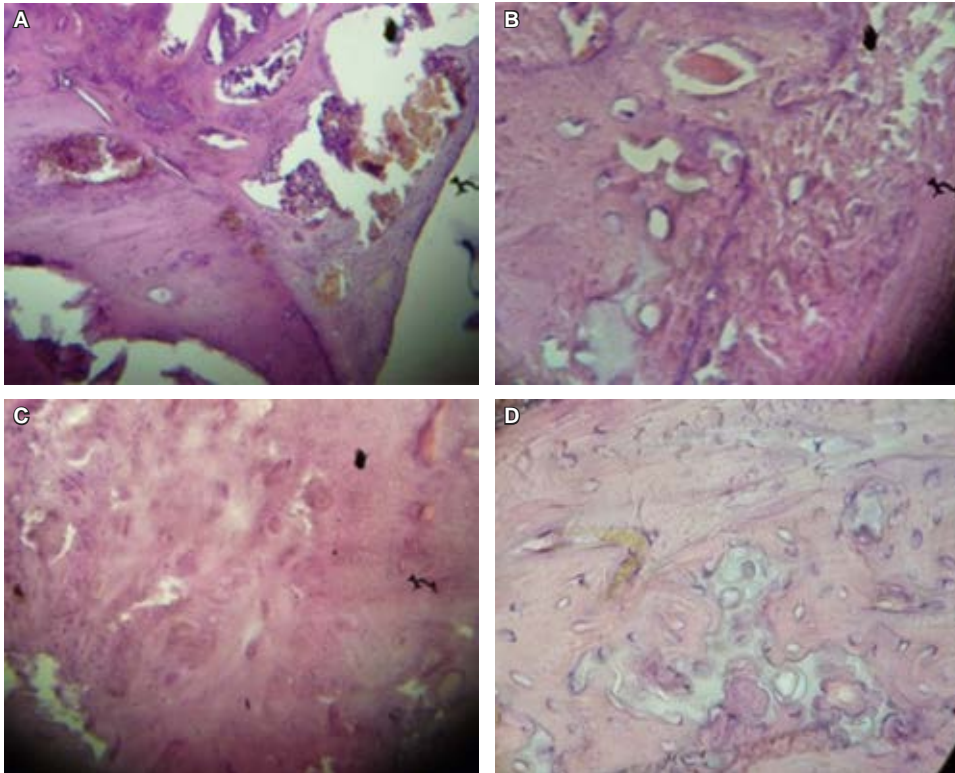
Escala propuesta por Castillo.¹¹Scale proposed by Castillo.¹¹

Figura 2:

Cortes histológicos observados a 40x donde se evidencia: **A)** Muestra del Grupo B, tibia derecha, nivel I de regeneración ósea. **B)** Muestra del Grupo B, tibia derecha, nivel II de regeneración ósea. **C)** Muestra del Grupo A, tibia derecha, nivel III de regeneración ósea. **D)** Muestra del Grupo B, tibia izquierda, nivel IV de regeneración ósea.

Fuente propia.

Histological cuts at 40x magnification where it is observed: A) sample of group B, right tibia, bone regeneration level I, B) sample of group B, right tibia, bone regeneration level II, C) sample of group A, right tibia, bone regeneration level III, D) sample of group B, left tibia, bone regeneration level IV. Source: Own elaboration.

ceder a realizar rasurado y asepsia del área quirúrgica con solución yodada; posteriormente se llevó a cabo el marcaje de cada grupo y subgrupo mediante aros de colores en la cola. El color rojo representó la HA FOULA, mientras que los aros de color negro representaron la HA Coralina. El número de aros representó el tiempo en el cual el animal fue sacrificado, un aro a las tres semanas, dos aros a las seis semanas y tres aros a las nueve semanas.

Los animales se anestesiaron localmente en el área quirúrgica con 0.25 mL de roxicaina al 2% con epinefrina 1:80,000 unidades; con una hoja de bisturí N° 15 estéril se realizó una incisión lineal en la cara interna del muslo y fueron separados los tejidos musculares con periostótomos (Legra P9) para descubrir la cara interna de la tibia de cada pata. A continuación, se empleó una fresa tallo largo troncocónica #702 a baja velocidad haciendo uso de un Mini Drill irrigación suficiente con solución fisiológica para la creación del defecto óseo con un área aproximada de 6.5 mm².

Los defectos óseos de las tibias derechas fueron rellenados con el tipo de hidroxiapatita correspondiente a cada grupo experimental «A» y «B», dejando el defecto óseo de la tibia izquierda libre de biomaterial para control fisiológico del proceso de regeneración ósea. Se

limpiaron y suturaron las heridas musculares con sutura reabsorbible Vicryl® 4-0 y las heridas en piel con sutura no reabsorbible de Nylon 3-0 (Figura 1). Se administró medicación analgésica postoperatoria (meloxicam 1.0 mg/kg de peso, una vez al día por tres días, vía intramuscular) y antibiótica (lincomicina 0.015 mL aproximadamente, suministrada en dosis única, vía subcutánea) en dosis aproximada de 0.05 cm³ cada uno.

Se dio seguimiento clínico postquirúrgico a las tres, seis y nueve semanas, valorándose las condiciones del microambiente de las jaulas y parámetros clínicos de los animales, se procedió a la eutanasia de cinco animales de cada grupo en el orden temporal descrito con el fin de obtener las muestras necesarias que fueron inmersas en formol al 10% para su posterior estudio.

Procedimiento postquirúrgico

Para el estudio histopatológico de las muestras se consideraron 40 tibias, excluyéndose 15 muestras del control fisiológico debido a factores económicos, además existe conocimiento previo dentro de la línea de investigación de la fisiología normal del modelo animal seleccionado; de igual manera, fueron excluidas cinco muestras de tibias derechas por presencia de callo óseo.

Una vez obtenidas las muestras se procedió a realizar la inclusión en parafina y se efectuaron los cortes correspondientes. Los cortes fueron analizados con microscopia de luz de acuerdo con la escala modificada propuesta por Castillo,¹¹ donde se toman en cuenta los indicadores: *cuerpo extraño*, *tejido de granulación*, *osteoblastos*, *formación osteoide*, *osteocitos* y *hueso maduro*, y fueron evaluados según la cantidad de células observadas por campo: ausente (0), escaso (< 5), moderado (5-10) y abundante (> 10). A continuación se estableció el nivel de regeneración ósea de acuerdo con los indicadores: nivel I (25%), nivel II (50%), nivel III (75%), nivel IV (100%) (Figura 2).

El análisis de los resultados se llevó a cabo desde un punto de vista comparativo tomando en cuenta los dos grupos experimentales (representados por cada tipo de HA) más el control fisiológico presente en cada uno. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico SPSS para Windows, versión 2.0. Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva básica, utilizando distribución de frecuencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar los cortes histológicos a la **tercera semana**, se observó que la mayoría de las muestras se ubicaron en el nivel II de regeneración ósea (*Nivel II de RO*) en ambos grupos, destacándose la presencia de tejido de granulación y ciertas zonas de mineralización osteoide. Sin embargo, la **HA FOULA** alcanzó el *nivel III de RO* en 60% de las muestras, con focos de mineralización osteoide en comparación con la **HA Coralina** cuyo porcentaje fue similar, pero ubicándose en el *nivel II de RO* (Figura 3).

La presencia de tejido de granulación coincide con lo expuesto por Harms,¹² el cual confirma que la presencia de vasos sanguíneos proporciona el suministro adecuado de sangre en el área afectada, paso previo a la actividad celular. Este hallazgo indica un equilibrio entre la resorción ósea y la formación de hueso durante el proceso de remodelación posterior a la implantación de los biomateriales, se observó formación de nueva matriz osteoide y neovascularización moderada alrededor de las partículas de hidroxapatita dentro del defecto.

Asimismo, se pudo determinar que el uso de la HA FOULA influye de manera favorable en el proceso de RO, puesto a que a la **tercera semana** postimplantación las muestras evaluadas alcanzaron el *nivel III de RO*, mientras que las tibias que permanecieron libres de biomaterial se clasificaron en el *nivel II de RO*. En estas muestras se observó la presencia de tejido

de granulación, con escasa formación de vasos sanguíneos, lo que coincide con Liao y colaboradores,¹³ que establecen que en el grupo de control el área del defecto permaneció notablemente llena de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatorio, donde sólo se detectó una formación menor de hueso nuevo en el borde de los defectos.

A la **sexta semana** los cortes histológicos de las tibias derechas pertenecientes a ambos grupos experimentales mostraron predominio de células osteoblásticas y centros de formación de osteoide (*nivel III de RO*).

Cabe destacar que las tibias derechas pertenecientes al grupo A fueron analizadas en su totalidad, ya que no se observó formación de callo óseo en las mismas, de tal manera que 100% (5/5) de las muestras alcanzó el *nivel III de RO*, mientras que en el grupo B se excluyó una tibia debido a la presencia de callo ubicándose 80% (4/5) de muestras en este nivel de RO. Se debe mencionar que el número de muestras de tibias izquierdas tomadas en cuenta para este subgrupo de estudio se redujo por las razones anteriormente señaladas, se excluyó un porcentaje considerable de las muestras: 40% (2/5) en el grupo A y 60% (3/5) en el grupo B (Figura 4).

En este periodo de evaluación se observó en ambos grupos experimentales (A y B) un incremento gradual en el porcentaje de regeneración, evidenciándose mayor cantidad de osteocitos en las muestras estudiadas, con disminución del número de osteoblastos por campo, lo cual indica maduración de la matriz osteoide previamente formada.

De igual forma, se evidenció en ambos grupos experimentales en las muestras correspondientes a las

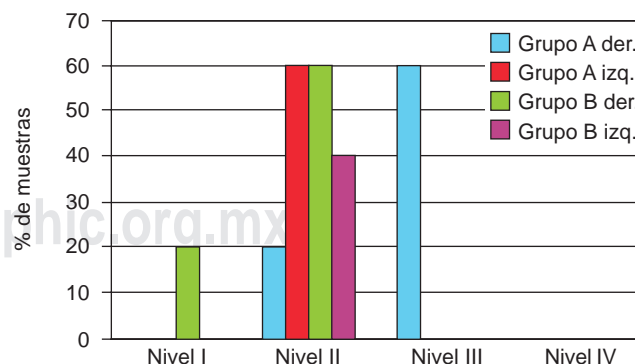


Figura 3: Nivel de regeneración ósea a las tres semanas postquirúrgicas.

Fuente propia.

Bone regeneration level at 3 weeks postoperative.
Source: Own elaboration.

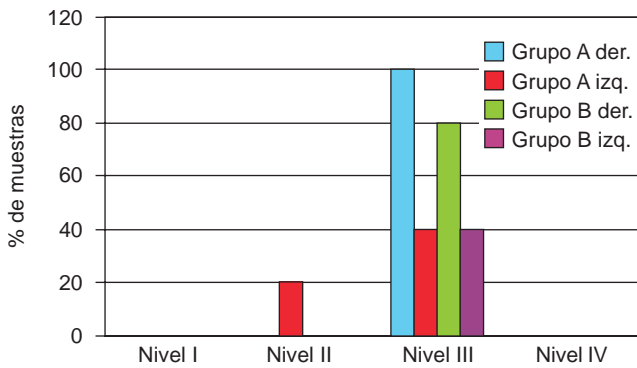


Figura 4: Nivel de regeneración ósea a las seis semanas postquirúrgicas. Fuente propia.

Bone regeneration level at 6 weeks postoperative. Source: Own elaboration.

tibias derechas la presencia de escasas células osteoclásticas, coincidiendo con lo expuesto por Harms¹² y Yépez y colaboradores,¹⁴ que establecieron que a las seis semanas comienza un proceso de reabsorción y aposición ósea alternado para la adaptación del hueso. De la misma manera, los resultados en este periodo de evaluación se asemejan a lo descrito por Martínez y su equipo,¹⁵ quienes hallaron a los 30 días postoperatorios en el grupo experimental un proceso de regeneración activo, que se caracterizó por la reabsorción de los bordes del defecto y la presencia de osteoblastos en el centro de la lesión.

Por otro lado, en algunas de las muestras pertenecientes a las tibias izquierdas se observó la formación de tejido conectivo fibroso, lo que coincidió de igual manera con lo expuesto por Harms.¹² Asimismo, Martínez y colaboradores¹⁵ obtuvieron resultados similares en las tibias del grupo control, detectaron reabsorción de los bordes del defecto y en su centro tejido condroide, colágeno y fibroblastos con formación de tejido osteoide, caracterizado por el mayor número de osteoblastos y menor cantidad de osteocitos.

Es necesario destacar que el *nivel III* de regeneración ósea con la **HA Coralina** fue alcanzado a las seis semanas, mientras que con la **HA FOULA** se alcanzó este nivel de regeneración a las tres semanas y se mantuvo hasta las seis semanas postquirúrgicas.

En el último periodo de evaluación a las **nueve semanas** postoperatorias se observó un predominio de focos de mineralización osteoide con predominio de células osteoblásticas, llenando la mayor parte del defecto, se clasificó como *nivel III* en ambos grupos experimentales grupo A (**HA FOULA**) y grupo B (**HA Coralina**).

Sin embargo, en 80% de los cortes histológicos correspondientes a las tibias derechas del grupo B se evidenció la formación de hueso maduro ubicándose en el *nivel IV* de regeneración ósea con mineralización de gran parte del defecto óseo, similar al hueso sano. Con respecto a las tibias izquierdas se redujo el número de muestras estudiadas, notándose la presencia de callo óseo en 40% de las tibias del grupo B (2/5); no obstante, en las muestras valoradas se apreciaron focos de mineralización osteoide, que se clasificaron como *nivel III* con respecto a la escala establecida (*Figura 5*). Nitin y su equipo¹⁸ obtienen resultados similares en el periodo de evaluación de la séptima y octava semanas postoperatorias, cuando observan en el grupo experimental que el tejido de granulación migra de la periferia a la región central del andamio; asimismo, detectaron que las estructuras óseas previamente formadas crecieron y comenzaron a conectarse, aumentando la cantidad de hueso recién formado.

A la **novena semana** de estudio en las muestras pertenecientes al **grupo experimental B** se observó la presencia de canales de Havers ya formados. De acuerdo con esto, se establece concordancia con el estudio realizado por Xiong y colaboradores¹⁶ donde la cantidad de nuevo hueso y cristales de calcio incrementó a las cuatro y ocho semanas, produciéndose la maduración continua del nuevo hueso. De igual manera, los resultados de este estudio coinciden con la investigación de Domínguez y colegas,¹⁷ en la que a las ocho semanas postoperatorias en el grupo control se detectó matriz extracelular granular, sobre la cual se localiza un número reducido de osteocitos en comparación con el grupo al que le fue implantado el biomaterial, por otra parte en el grupo experimental

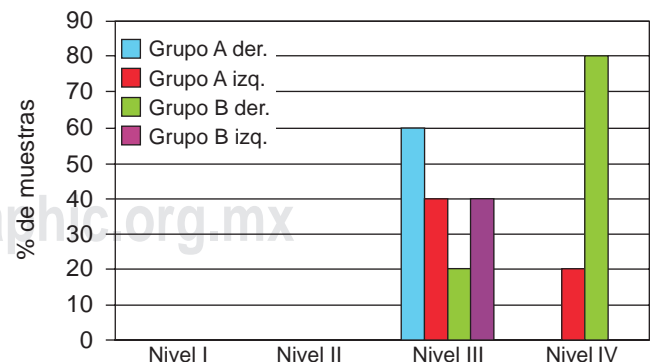


Figura 5: Nivel de regeneración ósea a las nueve semanas postquirúrgicas. Fuente propia.

Bone regeneration level at 9 weeks postoperative. Source: Own elaboration.

se observó la presencia de matriz extracelular conformada por láminas de osteocitos maduros. La cavidad remanente que queda posterior a un tratamiento quirúrgico debe obturarse de preferencia con materiales de origen autólogo para que sean las células madre las que lleven a cabo los procesos de osteoinducción y osteoconducción, garantizando la morfología y densidad ósea del área del defecto. Pero este tratamiento se ve limitado debido a la disponibilidad y la morbilidad del área donante, cantidades insuficientes de material y resorción incontrolada.^{2,18,19} En consecuencia, diversos biomateriales se presentan actualmente en el mercado para regeneración ósea guiada, destacando entre ellos la HA.

En este estudio se establece una relación de concordancia en el porcentaje de RO haciendo uso de un biomaterial; y se demuestra que el biomaterial HA es un excelente osteoconductor, puesto que al ser implantado en defectos óseos de animales de experimentación actúa como relleno y andamio para acelerar la actividad celular en pro de la regeneración ósea, demostrando excelentes resultados en cuanto a la tolerancia, biocompatibilidad y osteointegración, pues actúa como barrera para evitar la invaginación de tejidos blandos.^{7,20,21} Sin embargo, es necesario señalar que es recomendable la combinación de HA con otros biomateriales para alcanzar mejores resultados.^{5,22-24}

CONCLUSIÓN

Se demostró que la HA FOULA resulta eficaz en el proceso de regeneración ósea en defectos creados en tibias de ratas BIOU: Wistar, ya que promueve la formación de nuevo hueso en menor tiempo, comparada con la regeneración fisiológica. De igual forma, se observó que la HA FOULA aceleró el proceso de RO de los defectos durante el primer periodo de evaluación (tres semanas postquirúrgicas), en comparación con el control fisiológico y control comercial.

Se recomienda delimitar el área del defecto óseo mediante el uso de tinta china para facilitar su ubicación durante la evaluación histopatológica.

Original research

Histological parameters of bone guided regeneration with FOULA hydroxyapatite in BIOU: Wistar rats

Vanessa Pineda,* Oriana Olivares,* Jenair Yépez,§ Anajulia González^{||}

* Dental surgeon graduated from the Faculty of Dentistry, University of the Andes.

§ University of the Andes, Faculty of Dentistry, Professor of Oral Surgery.

|| University of the Andes, Faculty of Dentistry, Center of Dental Research (CIO).

University of the Andes (ULA), Mérida-Venezuela.

ABSTRACT

Guided bone regeneration is a procedure to induce the regeneration of bone defects using biomaterials such as hydroxyapatite (HA), platelet concentrates, lyophilized bone, among others. In the Faculty of Dentistry at the University of the Andes (FOULA) in Venezuela, an HA-based biomaterial whose efficacy had not yet been evaluated in vivo was synthesized. **Objective:** To determine the effectiveness of FOULAHA in guided bone regeneration of bone defects created in tibia bones of BIOU: Wistar rats. **Methodology:** 33 male rats (BIOU: Wistar strain) were selected. A bone defect was created in both back tibias, the biomaterial being inserted only in the right tibia. Two experimental groups of 15 animals each were formed per type of HA (FOULA and coralline); in turn, these groups were divided into subgroups of 5 animals each according to study time (3, 6 and 9 weeks). The data were evaluated by histopathology. **Results:** The levels reached were level III of RO (HA-FOULA) and level II (HA-Coral). At 6 and 9 weeks, the percentage of RO, using HA-Coral, increased to level IV. However, statistically no significant differences were observed between the groups. **Conclusion:** FOULA HA was effective for BR in defects created in tibias of BIOU: Wistar rats.

Keywords: Hydroxyapatite, biomaterial, bone defect, bone regeneration, BIOU: Wistar rats.

INTRODUCTION

In dental practice, one of the main challenges is the replacement of hard tissues lost due to injuries, pathologies or surgical procedures. This is the reason that different regenerative methods in bone defects have been widely studied in recent years, focusing on the creation of new bone in areas where it is needed.^{1,2}

Guided bone regeneration (GBR) is a therapeutic procedure that involves inducing the regeneration of bone defects rather than healing.³ It is based on the use of membrane barrier systems that isolate a certain bone defect, keeping out cells from the gingival epithelium and connective tissue that may interfere with the osteogenic potential of bone tissue in the zone of the defect.¹ It is a predictable and effective technique when performed after previous analysis of the case.⁴ The materials used to perform this technique have to meet certain requirements, such as easy handling, biocompatibility, cell occlusivity, space generation, tissue integration, and long enough presence to allow for cell proliferation.⁵

Hydroxyapatite (HA) is a biocrystal made up of calcium, phosphorus, and hydrogen atoms, which functions as an osteoconductive material and has high biocompatibility and bioaffinity with living tissues.

Today it is the most widely used biomaterial in GBR; it constitutes together with type I collagen one of the main components of bone. HA has no osteogenic properties, it does not stimulate the formation of new bone. However, it has osteoconductive properties as it provides a favorable matrix for the constant deposit of new bone due to its ability to establish chemical exchanges and to form bonds with living tissue.⁶⁻¹⁰

HA can be obtained through several methods, mainly by chemical precipitation, which consists of adding one phosphate solution to another with Ca⁺⁺ ions under controlled conditions. HA of ceramic origin is made up of high density and high purity spherical particles, obtained by heating amorphous calcium phosphates. The medium used and the temperatures at which this type of HA is made are the determining factors of the crystalline structure of the material, and influence its porosity and solubility as well. On the other hand, HA can naturally be obtained from three types of living beings, namely cattle, coral, and algae.⁶

The FOULA HA was previously tested *in vitro*, complying with phases I and II of *in vitro* biological assays. Yet, no *in vivo* studies had been conducted through pre-clinical trials to verify the effectiveness of the material, prevent and control potential toxic effects, and assess its risk-benefit ratio. Hence the goal of this research was to determine histopathological parameters of guided bone regeneration in bone defects created in tibias of a strain of Wistar rats bred at the Bioterium (animal facility) of the University of the Andes in Venezuela (BIOU: Wistar rats).

METHODOLOGY

This study followed the guidelines of the Code of Bioethics and Biosafety and was approved by the Bioethics Commission of the Bioterium of the University of the Andes (BIOULA) for use of experimental animals. A total of 33 male rats of the BIOU: Wistar strain were selected, with an average weight between 300-450g. Two experimental groups (15 animals each) were formed for each type of HA tested (FOULA and coralline); in turn, these groups were divided into subgroups (5 animals each) depending on the time of sacrifice (3, 6 and 9 weeks) of the rats. Three animals represented the control-control group in order to assess that environmental parameters did not influence the development and outcome of the study.

Surgical procedure

First, the animals were sedated with an injection of 0.7cc of ketamine (100 mg/kg) combined with xylazine

(5 mg/kg) by intraperitoneal route. The sedation status was tested by puncture in tail and legs before proceeding to shaving and asepsis of the surgical area with iodized solution. Next, each group and subgroup was marked by means of colored rings in the rat's tail. FOULA HA was identified by red rings and coralline HA by black rings. The number of rings represented the time at which the animal was sacrificed, i.e. 1 ring at 3 weeks, 2 rings at 6 weeks, and 3 rings at 9 weeks.

The animals were anesthetized locally in the surgical area with 0.25ml of 2% roxycaine with epinephrine 1:80,000 units. A linear incision was made in the inner face of the thigh with a #15 sterile scalpel and muscle tissues were separated with periosteotomes (Legra P9) to expose the inner face of each leg's tibia. Subsequently, a #702 long-stem conical bur was used at low speed using a minidrill of sufficient irrigation with physiological solution for the creation of the bone defect with an approximate area of 6.5 mm².

Bone defects of the right tibias were filled with the type of HA corresponding to each experimental group («A», FOULA HA, and «B», coralline HA), leaving the bone defect of the left tibia free of biomaterial for physiological control of the bone regeneration process. Muscle wounds were cleaned and sutured with absorbable 4-0 vicryl suture and skin wounds with non-absorbable 3-0 Nylon suture (*Figure 1*).

Postoperative analgesic medication (meloxicam 1.0 mg/kg body weight, 1 time daily for 3 days, intramuscularly) and antibiotic (lincomycin, about 0.015 mL, supplied in single dose, subcutaneously) were administered at doses of approximately 0.05 cm³ each.

Postsurgical clinical follow-up was made at 3, 6 and 9 weeks, assessing the microenvironment conditions of the cages and clinical parameters of the animals. Then 5 animals from each group were euthanized in the temporal order described for obtaining the samples, which were immersed in 10% formaldehyde for further study.

Postsurgical procedure

For the histopathological study of the samples 40 tibias were considered. Fifteen samples were excluded of physiological control due to economic factors; besides, there was prior knowledge within the line of research of the normal physiology of the animal model selected. Also, 5 samples of right tibias were excluded due to presence of bone callus.

Once the samples were obtained, paraffin embedding was carried out and the corresponding cuts were made. The cuts were analyzed with light microscopy according to Castillo's modified scale,¹¹

taking into account the following indicators: Foreign body, granulation tissue, osteoblasts, osteoid formation, and osteocytes and mature bone. The cuts were evaluated according to the amount of cells observed by field as follows: absent (0), scarce (< 5), moderate (5-10), and abundant (> 10). The level of bone regeneration was then established as level I (25%), level II (50%), level III (75%), and level IV (100%) (Figure 2).

The results were analyzed comparing the two experimental groups (each representing a type of HA material) plus the physiological control present in each group. The data were analyzed using basic descriptive statistics and frequency distribution. The SPSS statistic program for Windows, version 2.0, was used for data processing.

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of histological cuts at the third week showed that most samples in both groups were located at level II of bone regeneration (BR level II), with presence of granulation tissue and certain areas of osteoid mineralization. However, FOULA HA reached BR level III in 60% of samples, with spots of osteoid mineralization in comparison with coralline HA, whose percentage was similar, but located at BR level II (Figure 3).

The presence of granulation tissue agrees with results by Harms,¹² who argues that the presence of blood vessels provides adequate blood supply in the affected area, a prior step to cellular activity. This finding points to a balance between bone resorption and bone formation during the remodeling process after implantation of biomaterials. New osteoid matrix formation and moderate neovascularization were observed around the HA particles within the defect.

It was also possible to determine that the use of FOULA HA has a positive influence on the BR process, since at the third week post-implantation the samples evaluated reached BR Level III, whereas the tibias that remained free of biomaterial were at BR level II. In these samples the presence of granulation tissue was observed, with poor formation of blood vessels, in agreement with Liao et al.,¹³ where in the control group the area of the defect remained remarkably filled with blood vessels and inflammatory infiltrate, while only a minor formation of new bone was observed at the edge of the defects.

At the sixth week, histological cuts of the right tibias belonging to both experimental groups showed predominance of osteoblastic cells and focal areas of osteoid formation (BR level III).

All the right tibias in group A were analyzed, since no bone callus formation was presented in any of them, so 100% (5/5) of the samples reached BR level III, whereas in group B one tibia was excluded due to the presence of bone callus, so 80% (4/5) of the samples reached BR level III. On the other hand, the number of left tibias considered for both sub-groups was reduced due to bone callus formation, so a considerable percentage of the samples, 40% (2/5) in group A and 60% (3/5) in group B, were excluded (Figure 4).

At six weeks, a gradual increase in the percentage of regeneration was observed in both experimental groups, with higher number of osteocytes evident in the samples studied, and a decrease in the number of osteoblasts per field, which indicates maturation of the previously formed osteoid matrix.

In addition, the presence of few osteoclastic cells was evident in both experimental groups in the samples corresponding to the right tibias. Like Harms¹² and Yopez et al.,¹⁴ we found that at six weeks begins an alternating process of bone apposition and resorption for bone adaptation. Similarly, our results in this evaluation period agreed with those of Martinez et al.,¹⁵ who found in the experimental group at 30 days postoperative a process of active regeneration characterized by the resorption of the edges of the defect and the presence of osteoblasts in the center of the injury.

On the other hand, in some of the samples of left tibias the formation of fibrous connective tissue was observed, coinciding with results by Harms.¹² Also, Martinez et al.¹⁵ obtained similar results in the tibias of the control group, noting resorption of the edges of the defect and chondroid tissue in its center, as well as collagen and fibroblasts with osteoid tissue formation, characterized by the greater number of osteoblasts and less number of osteocytes.

Noteworthy, coralline HA reached BR level III at six weeks, while FOULA HA reached this level at 3 weeks and maintained it up to the ninth post-surgical week.

In the last evaluation period, at nine weeks post-operative, a predominance of osteoid mineralization focal areas with a large number of osteoblastic cells was observed, filling most of the defect. This growth was classified as BR level III in both experimental groups.

However, in 80% of histological cuts corresponding to the right tibias of group B mature bone formation was evident placing them at BR level IV with mineralization of much of the bone defect, similar to healthy bone. With regard to the left tibias, the number of samples studied was reduced, since 40% of the tibias of group B (2/5) had bone callus. Nonetheless,

focal areas of osteoid mineralization were observed in the samples, which were classified as BR level III (Figure 5). In their research, Nitin et al.¹⁸ obtained similar results in the evaluation period at the seventh and tenth postoperative week. They noted in the experimental group that granulation tissue migrated from the periphery to the central region of the scaffold construct. They also observed that previously formed bone structures grew and began to connect, thus increasing the amount of newly formed bone.

At the ninth week of study, the presence of Haversian canals already formed was observed in the samples of group B. This is consistent with the study by Xiong et al.,¹⁶ where the amount of new bone and calcium crystals increased at 4-8 weeks, resulting in continuous maturation of the new bone. Our results agreed also with those of Dominguez et al.,¹⁷ where at eight weeks post-operative an extracellular matrix of granulation tissue was observed in the control group, with a small number of osteocytes in comparison with the group that received the biomaterial. In our study, an extracellular matrix made up of mature osteocyte sheets was observed in the experimental group.

The cavity left after a surgical treatment should preferably be filled with materials of autologous origin, so that the stem cells carry out the osteoinduction and osteoinduction processes, thus ensuring the appropriate morphology and bone density in the defect area. Yet, this treatment is limited due to availability or insufficient amount of material, morbidity of the donor area, and uncontrolled resorption.^{2,18,19} As a result, various biomaterials –including HA– are currently offered on the market for guided bone regeneration.

In this study, a concordance relationship was established in the percentage of attained BR using a biomaterial. We showed that HA is an excellent material for osteoconduction. When implanted in bone defects of experimental animals, it acts as a filler and scaffold to accelerate cellular activity for BR, demonstrating excellent results in terms of tolerance, biocompatibility, and osteointegration. HA also acts as a barrier to prevent soft tissue intussusception.^{7,20,21} However, it is recommended to combine HA with other biomaterials to achieve better results.^{5,22-24}

CONCLUSION

FOULA HA was shown to be effective in the BR process in defects created in tibias of BIOU: Wistar rats. It promotes the formation of new bone in less time, as compared with physiological regeneration. Furthermore, FOULA HA accelerated BR at the first evaluation period (3 post-surgical

weeks) in comparison with the physiological and the commercial controls.

Lastly, a marker such as Chinese ink should be used to delimit the area of the bone defect in order to facilitate its location during histopathological evaluation.

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Suárez D. Principios básicos en regeneración ósea guiada. *Acta Bioclínica*. 2012; 2 (3): 89-116.
2. López M, Kitrilakis A, Carbone C. Desarrollo y evaluación in vivo de un biomaterial a base de sulfato de calcio para regeneración ósea. 2007; Disponible en: http://www.presi.unlp.edu.ar/secyt/cyt_html/ebec07/pdf/lopezm.pdf.
3. Simion M, Fontana F, Rasperini G, Maiorana C. Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluoroethylene membrane and combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio Oss). *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18 (5): 620-629.
4. Peral B, Redondo L, Verrier A, Serrat A, Torres M, Vaquero C. Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*. 2008; 30 (5): 313-323.
5. Velazco G, González A, Ortiz R, Yépez J. Membranas tridimensionales de Hidroxiapatita y Quitosano como terapéutica en regeneración ósea guiada. Estudio de caso. *Rev Venez Invest Odont IADR*. 2014; 2 (1): 27-34.
6. Pilloni A, Pompa G, Saccucci M, Di Carlo G, Rimondini L, Brama M, Zeza B, Wannenes F, Migliaccio S. Analysis of human alveolar osteoblast behavior on a nano-hydroxyapatite substrate: an *in vivo* study. *BMC Oral Health*. 2014; 14 (22): 14-22.
7. Yépez J. *Estudio comparativo de la regeneración ósea con tres tipos de hidroxiapatita: análisis ultra estructural en ratas Sprague Dawley*. [Tesis de Maestría]. Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes; 2014.
8. Liuyun J, Chengdong X. Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering. *J Biomed Sci*. 2009; 16 (65): 1-10.
9. Gleeson J, Plunkett N, O'Brien F. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *Eur Cell Mater*. 2010; 4 (20): 218-230.
10. Díaz A, Fonseca M, Covo E. Injerto de tejido conectivo subpediculado con utilización de hidroxiapatita para aumento de reborde alveolar: reporte de un caso. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*. 2008; 5 (1): 48-55.
11. Castillo L. *Efectividad del plasma rico en plaquetas sobre la regeneración ósea: estudio en animales de laboratorio*. [Tesis de Maestría]. Mérida-Venezuela. Universidad de los Andes; 2009.
12. Harms C, Helms K, Taschner T, Stratos I, Ignatius A, Gerber T, Lenz S et al. Osteogenic capacity of nanocrystalline bone cement in a weight-bearing defect at the ovine tibial metaphysis. *Int J Nanomedicine*. 2012; (7): 2883-2889.
13. Liao L, Yang S, Miron, Wei J, Zhang Y, Zhang M. Osteogenic Properties of PBLG-g-HA/PLLA Nanocomposites. *PLoS One*. 2014; 9 (9): e105876.
14. Yépez J, Ortiz R, Velazco G, González A. Resultados de la osteointegración con hidroxiapatita coralina tratada térmicamente: análisis ultraestructural en ratas Sprague Dawley. *Acta Bioclínica*. [Versión en línea] 2015. 5 (10): 125-139.

15. Martínez M, Pacheco A, Vargas M. Evaluación histológica de biocompatibilidad y bioconducción del compuesto hidroxiapatita-lignina implantado en tibia de conejos. *Rev MVZ*. 2009; 14 (1): 1624-1632.
16. Xiong Y, Ren C, Zhang B, Yang H, Lang Y, Min L, et al. Analyzing the behavior of a porous nano-hydroxyapatite/polyamide 66 (n-HA/PA66) composite for healing of bone defects. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 485-494. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894953/>.
17. Domínguez A, Villaseñor C, Villegas F, León B, Piña C. Descripción histológica de la regeneración ósea en cresta iliaca de conejos implantados con Nukbone a las 4, 8, 12 y 16 semanas. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. 2007; 6 (6): 88-95.
18. Nitin S, Alok K., Deepak G, Kainat K, Dhirendra S, Bhushan P, Vivek P, Naibedya C, Alok D, Jayesh R. *PLoS One*. 2013; 8 (10): e77578.
19. Jaramillo C, Rivera J, Echavarría A, O'Byrne J, Congote D, Restrepo L. Comparación de las propiedades de osteoconducción y osteointegración de una hidroxiapatita reabsorbible comercial con una hidroxiapatita reabsorbible sintetizada. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2009; 22 (2): 117-130.
20. Meseguer L, Alcaraz M, Vicente V, Clavel-Sainz M, Galian A. Respuesta ósea al implante del compuesto beta-fosfatotricálcico-colágeno (β -FTC-C). Estudio «in vivo» en conejos. *Rev Esp Cir Osteoart*. [Versión en línea] 1994; 29: 125-132.
21. Téllez J, Guerrero A, Torres B. Estudio de hidroxiapatita natural vs sintética en su aceptación biológica y eficacia regenerativa ósea en modelos animal. *Oral*. 2009; 32 (10): 533-536.
22. Quintana J, Gonzalez R, Quintana M. Resultados de 15 años empleando la Hidroxiapatita Coralina® HAP-200 como implante óseo en cirugía maxilofacial. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*. 2010; 41: 1-9. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181620500016.pdf>.
23. Sagar N, Pandey AK, Gurbani D, Khan K, Singh D, Chaudhari BP, et al. *In-vivo* efficacy of compliant 3D nano-composite in critical-size bone defect repair: a six month preclinical study in rabbit. *PloS One*. 2013; 8 (10): e77578.
24. Oryan A, Parizi A, Sarvestani Z, Bigham A. Effects of combined hydroxyapatite and human platelet rich plasma on bone healing in rabbit model: radiological, macroscopical, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank*. 2012; 13 (4): 639-651.

Dirección para correspondencia/
Mailing address:
Vanessa Pineda
E-mail: pinedaava@gmail.com