

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

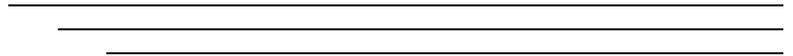


“HORMONA DE CRECIMIENTO Y
OSTEOINTEGRACIÓN EN LA CAVIDAD
ORAL”

Cecilia Vander Worf Úbeda
Granada, 2007

*A mis padres, Fernando y Gladys, a Antonio
y Federico, por estar siempre que los necesito.*

CERTIFICACIONES



Dr. ANTONIO CUTANDO SORIANO, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, certifica que:

D^a. Cecilia Vander Worf Úbeda, Licenciada en Odontología, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado: “Hormona de crecimiento y osteointegración en la cavidad oral”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 14 de Diciembre de 2007

El director,

La interesada,

Fdo.: Antonio Cutando Soriano

Fdo.: Cecilia Vander Worf Úbeda

Dr. GERARDO GÓMEZ MORENO, Profesor Asociado del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, certifica que:

D^a. Cecilia Vander Worf Úbeda, Licenciada en Odontología, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado: “Hormona de crecimiento y osteointegración en la cavidad oral”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 14 de Diciembre de 2007

El director,

La interesada,

Fdo.: Gerardo Gómez Moreno

Fdo.: Cecilia Vander Worf Úbeda

Dr. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, certifica que:

D^a. Cecilia Vander Worf Úbeda, Licenciada en Odontología, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado: “Hormona de crecimiento y osteointegración en la cavidad oral”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 14 de Diciembre de 2007

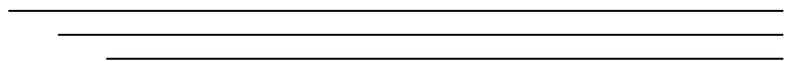
El director,

La interesada,

Fdo.: Darío Acuña Castroviejo

Fdo.: Cecilia Vander Worf Úbeda

PUBLICACIONES



PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE HAN FINANCIADO EL ESTUDIO:

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias al Proyecto de Investigación titulado: ***“Estudio del sinergismo entre Melatonina y Hormona de Crecimiento (GH) sobre los procesos de osteointegración en implantes dentales y regeneración ósea en la cavidad oral”***, financiado por:

- Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Sanidad y Consumo
- (Ref.: PI041610).
- Ministerio de Educación y Ciencia (Proyecto PETRI nº. 95-0885-OP).
- Instituto de Salud Carlos III (Red FIS G03/137).
- Grupos de Investigación CTS-101 y CTS-263 (Junta de Andalucía).

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA LÍNEA DE TRABAJO DE

ESTA TESIS DOCTORAL:

- Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. J Pineal Res 2003; 35:239-44.
- Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños MJ, Acuña-Castroviejo D, Hom-Lay Wang. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. J Periodontol 2006; 77(9):1533-8.
- Arana C, Cutando A, Ferrera MJ, Gómez-Moreno G, Vander Worf C, Bolaños MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients. J Oral Pathol Med 2006; 35:554-9.
- Cutando, A., Gómez-Moreno, G. and Arana, C. Superficies bioactivas en implantología: una nueva perspectiva. Avances en Periodoncia 2007, vol.19, suppl.1, p.43-50.
- Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, et al. Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal. J Pineal Res. 2007 Apr;42(4):419-20.

- ✦ Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of Beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol* 2007, 78 (3): 576-83.
- ✦ Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter Rj. Melatonin: potential functions in the oral cavity. *J Periodontol*. 2007 Jun; 78(6):1094-102. Review.
- ✦ Gómez-Moreno G, Cutando-Soriano A, Arana C, Galindo P, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang H-L. Melatonin expression in periodontal disease. *J Periodont Res* 2007; 42: 536-540.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS:

Autores: Gómez-Moreno G, Arana C, Cutando A, Bolaños J, Acuña-Castroviejo
Título: Comportamiento de la melatonina en pacientes con alteraciones del flujo salival
Tipo de participación: Comunicación Oral
Congreso: XXXVII Reunión Anual de SEPA
Publicación: Actas del Congreso
Lugar de celebración: Tarragona
Fechas de celebración: 13-15 Noviembre 2003

Autores: Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo
Título: Relación entre los niveles de melatonina y estado periodontal en diabéticos
Tipo de participación: Comunicación Oral
Congreso: XXXVII Reunión Anual de SEPA
Publicación: Actas del Congreso
Lugar de celebración: Tarragona
Fechas de celebración: 13-15 Noviembre 2003

Autores: Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo
Título: Melatonin in plasma and saliva and lymphocyte subpopulations in periodontal patients.
Tipo de participación: Póster.
Congreso: 16th Annual International Conference on Special Care Issues in Dentistry and the 17th Congress of the International Association for Disability and Oral Health (IADH).
Publicación: *Special Care in Dentistry* 2004, 24: 169.
Lugar de celebración: Calgary, Alberta, CANADÁ.
Fechas de celebración: 24-27 Agosto 2004.

Autores: Arana C, Cutando A, Gómez-Moreno G, Galindo P, Vander Worf C, Serrano J, Acuña-Castroviejo D.

Título: Efecto de la melatonina sobre el estrés oxidativo tras exodoncias seriadas en perros *Beagle*.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: IV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal (SECIB).

Publicación: Medicina Oral. IV Congreso Nacional SECIB: 81-82. 2005.

Lugar de celebración: Granada.

Fechas de celebración: 20-22 Octubre 2005.

Autores: Vander Worf C, Arana C, Cutando A, Gómez-Moreno G, Galindo P, Ferrera MJ, Acuña-Castroviejo D.

Título: Parámetros de estrés oxidativo en la saliva de pacientes diabéticos y adictos a drogas vía parenteral.

Tipo de participación: Comunicación oral.

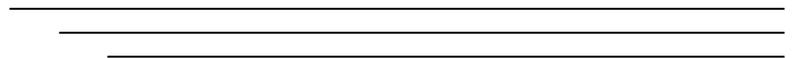
Congreso: IV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal (SECIB).

Publicación: Medicina Oral. IV Congreso Nacional SECIB: 78. 2005.

Lugar de celebración: Granada.

Fechas de celebración: 20-22 Octubre 2005.

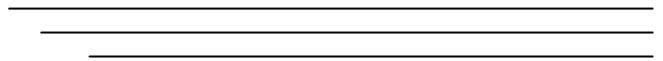
AGRADECIMIENTOS



- Al Prof. Antonio Cutando Soriano, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y participar en este proyecto. Su orientación, profesional en la universidad, ha sido fundamental para la realización de esta tesis doctoral.
- Al Prof. Gerardo Gómez Moreno, por su gran apoyo en los momentos difíciles, su perseverancia, y la confianza que ha depositado en mí.
- Al Prof. Darío Acuña Castroviejo, por permitirnos trabajar en su laboratorio y enseñarnos las técnicas necesarias para la realización de nuestra investigación.
- Al Dr. Carlos Arana Molina, por su gran compañerismo, su apoyo incondicional y su capacidad investigadora. La realización de esta tesis se la debo en gran medida a él.
- Al Dr. Fernando Muñoz, a la Dra. Mónica López Peña y a todo su equipo, por su excelente trabajo en la histomorfometría y por su gran predisposición y profesionalidad investigadora, que han posibilitado la consecución de nuestros objetivos.
- A D. Jesús Martín Zúñiga y D. Juan Serrano, director y veterinario respectivamente del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, por su colaboración en la fase experimental de este trabajo y por iniciarnos en el cuidado y manejo de los perros *Beagle*.
- A D. Rafael Olivares, director de la Biblioteca de la Facultad de Odontología y Biblioteconomía y Documentación de la Universidad de Granada, por su paciencia y tiempo dedicado a la búsqueda bibliográfica, por enseñarme a aprovechar todo lo que la biblioteca puede llegar a ofrecer.
- Al Prof. Jorge Bolaños, por el asesoramiento estadístico.

- A Implant Microdent System, por el apoyo y respaldo empresarial a este proyecto, y por su confianza en nuestro equipo investigador.
- A todas aquellas personas que, en definitiva, han hecho posible que se pueda realizar esta tesis, a todas ellas muchas gracias.

ÍNDICE



ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN.....	3
1. HORMONA DE CRECIMIENTO.....	3
1.1. BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN.....	3
1.2. ACCIONES BIOLÓGICAS.....	7
1.3. SOMATOMEDINAS.....	12
2. REMODELADO ÓSEO.....	14
2.1. FISIOLÓGÍA DEL HUESO.....	14
2.1.1. MATRIZ ORGÁNICA O SUSTANCIA OSTEOIDE.....	14
2.1.2. MATRIZ INORGÁNICA O MINERALIZADA.....	17
2.1.3. CÉLULAS ÓSEAS.....	18
2.2. MECANISMOS DE REABSORCIÓN ÓSEA.....	21
2.3. REGULACIÓN DE LA REABSORCIÓN ÓSEA.....	23
2.4. REMODELADO ÓSEO.....	25
2.5. FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO.....	28
2.5.1. PARATHORMONA.....	28
2.5.2. CALCITONINA.....	28
2.5.3. VITAMINA D.....	28
2.5.4. ESTRÓGENOS.....	28
2.5.5. GLUCOCORTICOIDES.....	29
2.5.6. HORMONA DE CRECIMIENTO.....	29
2.5.7. IGF – I Y II.....	29
2.5.8. CITOQUINAS.....	30
2.5.9. PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS ÓSEAS (BMP).....	31
2.6. OSTEOINTEGRACIÓN Y BIOLOGÍA ÓSEA EN IMPLANTOLOGÍA.....	31
2.7. PAPEL DE LA GH EN EL REMODELADO ÓSEO.....	32
OBJETIVOS.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
1. ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTO.....	37
1.1. EXODONCIAS.....	37
1.2. COLOCACIÓN DE IMPLANTES.....	39
1.3. SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DE LA MANDÍBULA.....	41
2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	42
2.1. PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DE MUESTRAS DE TEJIDO ÓSEO.....	42
2.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	47
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
RESULTADOS.....	51
1. RESULTADOS.....	52
1.1. BIC (<i>BONE-TO-IMPLANT CONTACT RATIO</i>).....	53
1.2. HUESO PERIIMPLANTARIO TOTAL.....	54
1.3. HUESO INTERROSCA.....	59
1.4. NEOFORMACIÓN ÓSEA.....	60
DISCUSIÓN.....	61

CONCLUSIONES.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS E IMÁGENES

FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la forma molecular de GH.....	3
Figura 2. Regulación de la secreción de GH.....	6
Figura 3. Unión GH-GHRH.....	7
Figura 4. Acciones biológicas de GH.....	8
Figura 5. Eje GH- IGF-I.....	10
Figura 6. Esquema general de las acciones de GH.....	11
Figura 7. Esquema de los mecanismos implicados en la reabsorción ósea.....	22
Figura 8. Mecanismos de regulación de la reabsorción ósea.....	23
Figura 9. Fases de Remodelado óseo.....	27
Figura 10. Implantes colocados en mandíbula de perros <i>Beagle</i>	39
Figura 11. Representación de los parámetros de osteointegración determinados en el estudio histomorfométrico.....	49
Figura 12. Porcentaje de contacto óseo en implantes control y tratados con GH.....	53
Figura 13. Porcentaje de hueso periimplantario total.....	54
Figura 14. Porcentaje de hueso interrosca.....	59
Figura 15. Porcentaje de neoformación ósea.....	60

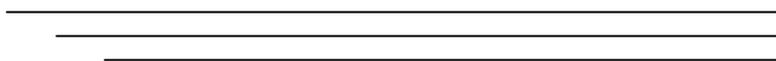
TABLAS

Tabla 1. Proteínas de la matriz osteoide.....	17
Tabla 2. Tinción Lévai Laczcó.....	46
Tabla 3. Parámetros histomorfométricos de osteointegración en implantes control y tratados con GH.....	50

IMÁGENES

Imagen 1. Corte histológico de un implante control.....	55
Imagen 2. Corte histológico de un implante tratado con GH tópica.....	56
Imagen 3. Vista histomorfométrica de un implante tratado con GH tópica.....	57
Imagen 4. Vista histomorfométrica de un implante control.....	58

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN:

1. Hormona de Crecimiento (GH)

1.1. Biosíntesis y secreción

La hormona de crecimiento (GH) es un compuesto polipeptídico, formado por 191 aminoácidos dispuestos en una sola cadena en la que existen dos puentes disulfuro que unen las cisteínas que ocupan las porciones 53 y 182 con las respectivamente localizadas en posiciones 165 y 189. Esta estructura con un peso molecular de 22 K (22 650 dalton), es la forma principal de secreción de la GH por la hipófisis anterior y la más abundante, tanto en el plasma como en las propias células somatotropas (Fig.1). En los últimos años, se ha identificado una serie de variantes, de ellas, la más importante, hasta el punto de representar un 20% de GH en la hipófisis, parece ser la forma 20 K ⁽¹⁾.

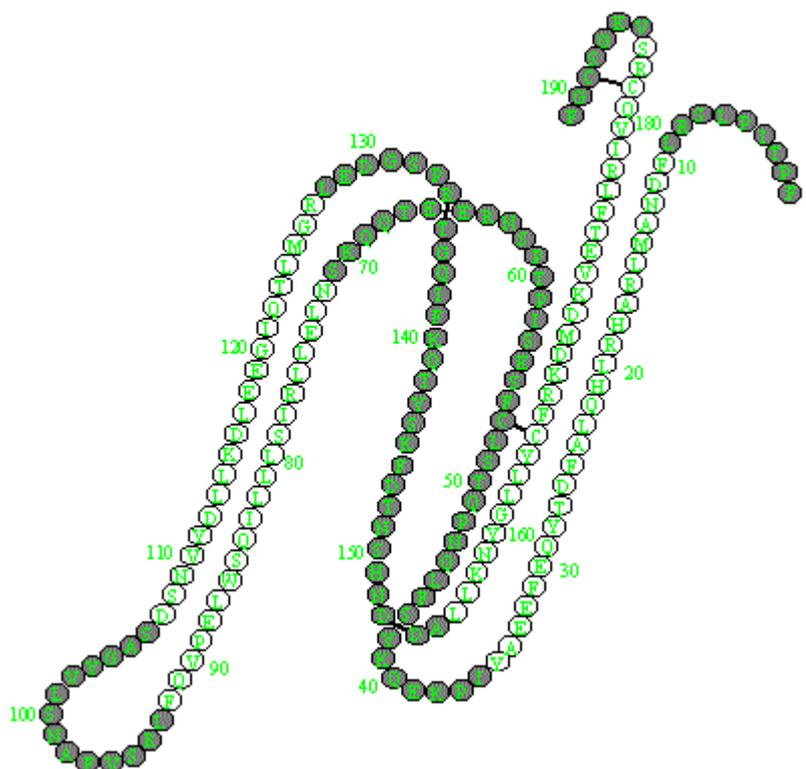


Fig. 1. Representación esquemática de la forma molecular de GH 22 K.

La GH está codificada por un único gen, localizado en el brazo largo del cromosoma 17. Este gen forma parte de una familia de cinco genes relacionados entre sí, que constituyen el denominado *cluster* de genes de GH. Este gen sólo se expresa en las células somatotropas de la pituitaria anterior, que son las productoras de GH. Son las células más numerosas de la hipófisis ⁽²⁾.

El ARN mensajero dirige la síntesis de una prehormona. Tras la eliminación de una señal peptídica, la hormona completa se almacena en gránulos. La síntesis de GH es estimulada por su hormona liberadora hipotalámica específica, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), y por la hormona tiroidea y el cortisol.

La secreción de GH por exocitosis es estimulada por la GHRH, un péptido hipotalámico de 44 aminoácidos. La GHRH interacciona con su receptor de la membrana plasmática, tras lo cual se generan como segundos mensajeros calcio, derivados del fosfatidilinositol y AMP cíclico.

La somatostatina (SS), un péptido hipotalámico con una forma de 14 y otra de 28 aminoácidos, es un potente inhibidor de la liberación de GH. La somatostatina bloquea no competitivamente la estimulación por GHRH. El inhibidor actúa a través de su propio receptor en la membrana plasmática, en parte al disminuir tanto la entrada de calcio en las células como la cantidad de AMP cíclico. La GH se segrega en pulsos originados por la liberación intermitente de GHRH hacia la sangre de las venas porta hipofisarias. La somatostatina también disminuye la frecuencia y amplitud de los pulsos de GHRH ⁽³⁾.

La secreción de GH depende de muchos factores. Sin embargo, la vía final común de la mayoría de los estimuladores de la GH es el aumento de GHRH, la disminución de la somatostatina o ambos. Por el contrario, las sustancias que suprimen la GH disminuyen la GHRH, aumentan la somatostatina o ambos efectos. Algunos agentes pueden modificar la secreción de GH mediante acción directa sobre las somatotropas.

La liberación de GH está regulada metabólicamente por los sustratos energéticos glucosa y ácidos libres, y por los aminoácidos. Una disminución brusca de las concentraciones de glucosa o de ácidos grasos libres estimula un gran aumento de la GH plasmática, mientras que la elevación de la cantidad de las mismas reduce considerablemente la GH plasmática. Tanto el ayuno breve como la privación prolongada de proteínas y calorías incrementan la secreción de GH. La obesidad, en cambio, reduce la respuesta de la GH ante cualquier estímulo, incluida la GHRH⁽⁴⁾.

La regulación de la secreción de GH por el sistema nervioso central adopta diversas formas. Se produce una oleada nocturna de GH 1 o 2 horas después del comienzo del sueño profundo. Por el contrario, el sueño ligero, asociado a movimientos oculares rápidos (sueño REM), inhibe la liberación de GH. Diversas situaciones de agresión, como traumatismos, cirugía, anestesia, etc, elevan la GH plasmática. Estos procesos actúan sobre las neuronas hipotalámicas secretoras de GHRH y somatostatina (SS) a través de diversas monoaminas neurotransmisoras.

Las concentraciones plasmáticas basales de GH en reposo son de 1 a 5 ng/ml. La hormona circula vinculada a una proteína (GHBP-I) de unión idéntica al dominio extracelular de los receptores de GH en la membrana plasmática.

La regulación de la secreción de GH por retroalimentación negativa tiene lugar a todos los niveles. La somatomedina (Sm), un producto periférico de la acción de la GH, ejerce una retroalimentación negativa de asa larga. Inhibe la liberación de esta última sobre la célula somatotropa, y estimula la liberación de somatostatina. La propia GH ejerce una retroalimentación negativa de asa corta, estimulando la liberación de somatostatina. La GHRH lleva a cabo una retroalimentación negativa de asa ultracorta a través de sinapsis con neuronas somatostatinérgicas⁽⁵⁾.

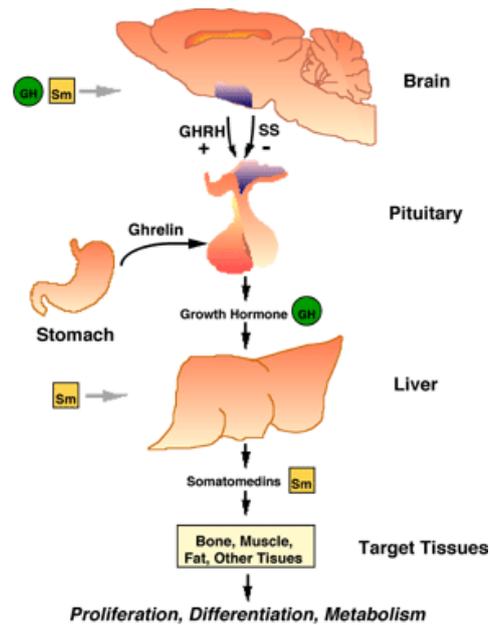


Fig. 2. Regulación de la secreción de GH. Dos péptidos hipotalámicos, uno inhibidor (SS) y otro estimulador (GHRH), regulan la liberación de GH. La retroalimentación negativa por la somatomedina (Sm), su producto periférico, se ejerce a nivel hipotalámico e hipofisario. Existe además una compleja regulación por sustratos e influencias neurales. Reproducida de www.biochem.northwestern.edu/.../GH-Axis.gif

RECEPTORES DE GH:⁽¹⁾

El receptor de la GH humana (GH-R) es una proteína transmembrana de 620 aminoácidos codificada por un gen ubicado en el cromosoma 5.

A diferencia de los que ocurre con la unión GH-GHBP-I (proteína transportadora), la unión de la hormona a su receptor es de 1:2, es decir, una molécula de la hormona debe unirse a dos moléculas del receptor para poder originar un complejo más activo, lo que está en consonancia con la existencia en la molécula de GH de dos sitios activos de unión. La importancia de este modo de unión viene determinada porque de esta forma el máximo efecto de GH se obtiene a concentraciones menores de las que serían necesarias para ocupar todos los receptores si la unión fuese mol a mol.

En la inducción de los efectos biológicos de GH existe al menos un doble mecanismo de acción:

- Mecanismo clásico de generación de mensaje tras la unión de la hormona a su receptor en la membrana plasmática.
- Actuación a nivel nuclear tras la internalización de GH acoplada al receptor.

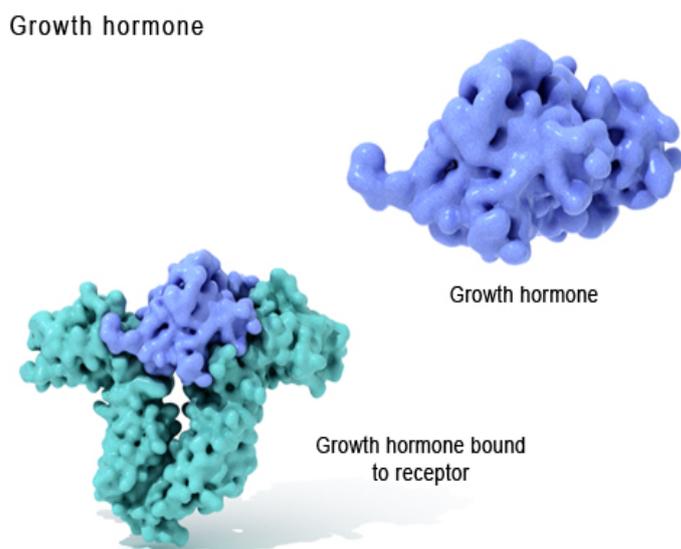


Fig.3. Unión de GH – GH-R. Reproducida de U.S National Library of Medicine.

1.2. Acciones biológicas de la GH:

CRECIMIENTO ⁽¹⁾

La GH estimula el crecimiento somático y actúa sobre el metabolismo intermediario estimulando el anabolismo proteico y la lipólisis. La marcada acción anabolizante de la GH se hace patente de forma inmediata tras la administración de la hormona a niños GH-deficientes por activación de todos los procesos implicados en la neosíntesis proteica. Aunque los efectos anabolizantes de la hormona de crecimiento ocurren en tejidos tan variados como hueso, cartílago, músculo, hígados y una serie de vísceras y glándulas, quizá es el músculo e hígado donde alcanzan mayor expresión (Fig. 4).

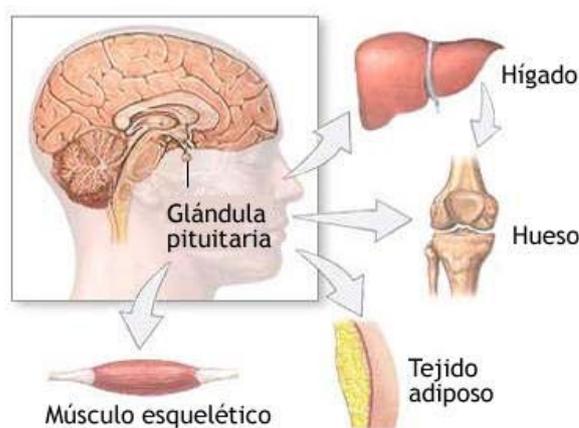


Fig. 4. Acciones biológicas de la GH. Reproducida de A.D.A.M Interactive anatomy. www.adam.com.

A nivel muscular, se observa un incremento del transporte de aminoácidos al interior de la célula, que aparece rápidamente y es bloqueable por inhibidores de la síntesis proteica. Unas horas más tarde hay un claro aumento del ARN ribosómico, de la síntesis de ADN y neosíntesis proteica. Estos mismos fenómenos ocurren en el hígado, donde la GH promueve la fabricación de gran número de proteínas (entre ellas las somatomedinas/IGF-I).

La síntesis de nuevas proteínas es un fenómeno clave para el crecimiento, tanto somático como visceral. El crecimiento somático va a efectuarse a expensas fundamentalmente, del crecimiento óseo que, tras el nacimiento, va a ser directamente dependiente del sistema GH-somatomedinas ⁽⁶⁾.

El crecimiento del hueso puede ser en longitud y en espesor. El desarrollo longitudinal depende del cartílago de crecimiento, que bajo la acción de la GH determina el alargamiento diafisario, mientras que el aumento de espesor óseo se produce por aposición perióstica. Histológicamente, el cartílago de crecimiento es una zona de gran multiplicación de condrocitos, que bioquímicamente se caracteriza por una intensa síntesis de grandes moléculas del grupo de los proteoglicanos, responsables de la estructura de la trama ósea. Durante el desarrollo tanto la proliferación celular como la síntesis de

macromoléculas está perfectamente compensada. Tras el mismo, el crecimiento óseo va a ser fundamentalmente dependiente de GH.

Por este motivo, en situaciones de déficit de GH se producirá el cese o la disminución del crecimiento lineal, ya que se interrumpen los procesos de proliferación y transformación de los condrocitos. El tratamiento con GH exógena estimula la condrogénesis y la aparición de osteoblastos ⁽⁷⁾.

Desde el punto de vista bioquímico se ha comprobado que en el cartílago y el hueso la GH incrementa la incorporación de SO₄ en los proteoglicanos, la incorporación de timidina en el ADN condrocítico y la conversión de prolina en hidroxiprolina en el colágeno. El que estos efectos no se observasen *in vitro* hizo suponer que la hormona no actuaba directamente, sino que lo hace a través de la somatomedina (mediador de la acción de la hormona somatotropa), también llamada IGF (*Insulin-like Growth Factor*).

La acción de la GH sobre el crecimiento óseo longitudinal queda así subordinado a la fabricación periférica, en el hígado, de un factor mediador responsable último de esta acción, estableciéndose un eje GH-somatomedina-crecimiento (Fig. 5).

Existe un sistema mucho más complejo, según el cual la propia hormona sería capaz de actuar también directamente sobre el cartílago de crecimiento. GH y somatomedina estimularían de esta forma diferentes poblaciones de condrocitos y la GH induciría directamente la diferenciación de estas células, haciendo que expresen el gen codificador de somatomedina. Los condrocitos diferenciados comenzarían a producir somatomedina, y ésta desencadenaría la proliferación clonal y maduración de nuevos condrocitos por mecanismos auto o paracrinos ⁽⁷⁾.

De esta forma, en la secuencia ordenada de acontecimientos que tiene lugar en la maduración celular en el cartílago, y que llevan el crecimiento longitudinal de hueso, la GH sería el primer desencadenante y la somatomedina el segundo.

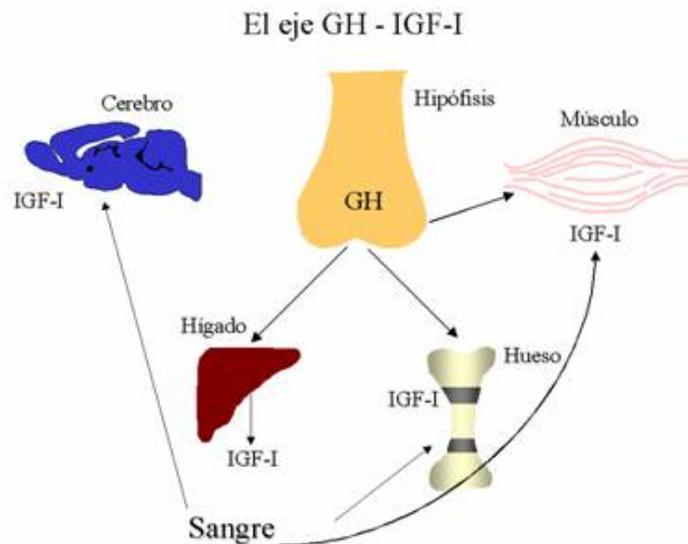


Fig.5. El eje endocrino de la hormona de crecimiento hipofisaria (GH) y del IGF-I hepático controla el crecimiento de muchos tejidos así como su funcionamiento adecuado. Reproducida de: Carro Díaz E, Trejo Pérez JL y Torres Alemán I. Efectos beneficiosos del ejercicio físico sobre el cerebro. Ciencia al día internacional, 2003. www.ciencia.cl/.../CADi_V5_N1_Art2_Fig1-ok.jpg

OTRAS ACCIONES:

Entre otras de las acciones que desempeña la GH, las siguientes son las más significativas, después del crecimiento:

- Lipolítica: la GH desempeña un papel en la regulación de niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, incrementando los segundos y disminuyendo los primeros. Con la destrucción de los triglicéridos y oxidación de los ácidos grasos se consigue la energía necesaria para la fabricación de proteínas ⁽¹⁾.
- Diabetógena: la GH influye sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos. Estimula la expresión del gen de la insulina. Sin embargo, también induce resistencia a la acción de la insulina. Se inhibe la captación de glucosa por las células musculares y adiposas, aumentando la concentración de glucosa plasmática. Aparece una hiperinsulinemia compensadora ⁽³⁾.

ESQUEMA GENERAL DE LAS ACCIONES DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

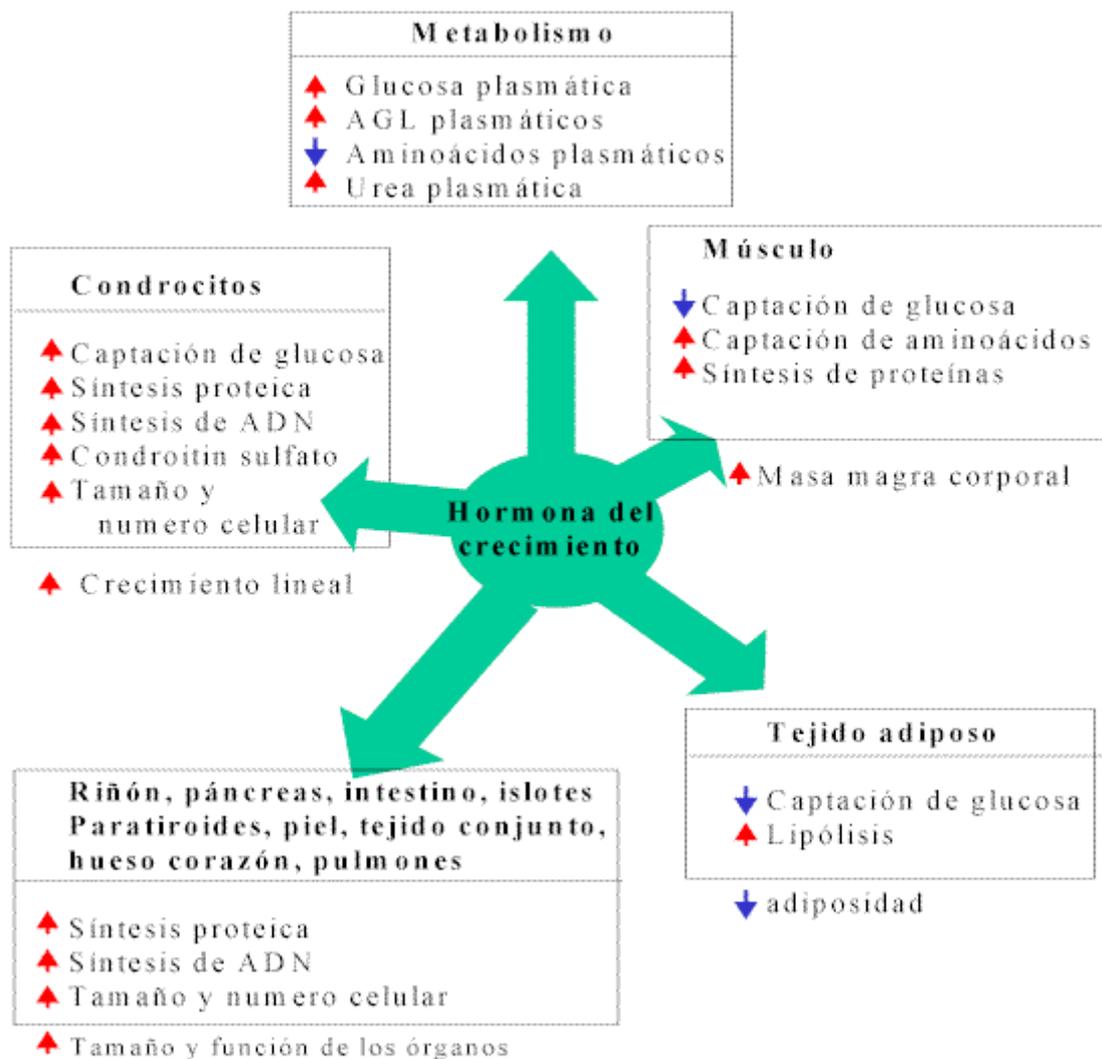


Fig. 6. Esquema general de las acciones de la GH. AGL ácidos grasos libres. Esquema tomado de: Insua MF, Fucks K. Hormona de crecimiento: fisiología y acción en el ejercicio físico. <http://www.efdeportes.com/> Revista Digital - Buenos Aires - Año 9 - N° 62 - Julio de 2003.

1.3. Somatomedinas (IGF) ^(1,3)

La acción básica de este factor es la de estimular la incorporación de sulfato a los proteoglicanos del cartílago, por lo que fue denominado factor de sulfatación. Pronto se vio que, además, era capaz de intervenir en bastantes más actividades metabólicas, pasando entonces a ser conocido como somatomedina, término con el que se expresaba su actividad de mediador del crecimiento somático.

Actualmente, se conoce que son dos formas peptídicas estructural y funcionalmente similares a la insulina, por lo que se les denomina IGF I y II (*Insulin-like Growth Factors*) con el que se resalta su analogía con la hormona pancreática como su papel sobre el crecimiento.

ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN

Estructuralmente, el IGF-I (SmC), es un péptido básico compuesto por 70 aminoácidos que presenta una secuencia aminoacídica similar a la proinsulina. El IGF-II (SmA) está compuesto por 67 aminoácidos, y es también muy similar a la proinsulina.

Los IGF se producen en muchos tejidos en respuesta a la GH. No obstante, los circulantes proceden principalmente del hígado. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide ⁽⁸⁾. Ambos tipos de factores circulan unidos a una serie de grandes proteínas ligadoras en el hígado (IGFBP de *IGF-binding protein*), que a su vez pueden ejercer efectos estimulantes o inhibidores sobre el hueso. Los IGF están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Por otro lado, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo ⁽⁹⁾.

El IGF-II es el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, es importante durante la embriogénesis, pero sus efectos sobre el esqueleto ya desarrollado actualmente se desconocen ⁽¹⁰⁾.

De este modo, la GH ejerce una acción indirecta sobre el hueso a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función.

CONTROL DE IGF-I ⁽¹¹⁾

La GH estimula la secreción de IGF-I por el hígado y seguramente también por otros tejidos, de forma que mientras en el plasma de sujetos deficitarios en esta hormona existe una disminución de los niveles de IGF-I (que rápidamente revierte al administrar GH exógena), está sumamente aumentada en los pacientes acromegálicos.

Existe un circuito *feed-back* entre GH/IGF-I. La elevación de la SmC circulante determina una inhibición de la liberación de GH, por estímulo de la secreción de SS hipotalámica, aunque no se descarta el que también pueda tener una acción inhibitoria sobre GHRH o incluso directa sobre las células somatotropas. Hay otras hormonas, como la insulina o las hormonas tiroideas, que también contribuyen a que la biosíntesis de IGF se desarrolle normalmente. Los esteroides sexuales desempeñan al parecer un papel más importante. Durante la pubertad, los cambios en sus niveles plasmáticos parecen ser precisamente la causa del incremento de la IGF-I asociada al estirón puberal ⁽¹²⁾.

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA IGF-I/GH

Las somatomedinas sirven de intermediario en las respuestas características a la GH del cartílago, el hueso, el músculo, el tejido adiposo, los fibroblastos y las células tumorales *in vitro*. Los individuos que carecen de capacidad de producir IGFs presentan un retraso del crecimiento, a pesar de sus concentraciones elevadas de GH ^(9,13).

La GH es capaz de estimular la proliferación y diferenciación de osteoblastos, que presentan receptores para la hormona, aumentando la incorporación de H³ timidina dentro de las células y también otros marcadores bioquímicos del fenotipo osteogénico, tales como el péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I (PICP), osteocalcina y fosfatasa alcalina. Los IGFs, a su vez, incrementan el número y de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno ⁽⁸⁾.

2. Remodelado Óseo

2.1. Fisiología del hueso

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que adopta dos variedades: cortical o compacto, y trabecular o esponjoso. Consiste esencialmente en una matriz orgánica o sustancia osteoide, matriz inorgánica o mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos ⁽¹⁴⁾.

2.1.1 MATRIZ ORGÁNICA O SUSTANCIA OSTEOIDE: ^(15,16)

La matriz orgánica o sustancia osteoide está compuesta por proteínas colágenas y no colágenas, y producida por los osteoblastos, representa alrededor de un tercio del peso del hueso (Tabla 1).

Colágeno óseo: aproximadamente el 90% de las proteínas de la matriz osteoide corresponde al colágeno tipo I, proteína fibrilar no soluble cuya estructura primaria posee una secuencia repetida del triplete de aminoácidos Gli-X-Y, en la que X e Y son prolina, hidroxiprolina o hidroxilisina. Además, en su molécula se encuentra la secuencia RGD (Arg-Gli-Asp), que es reconocida específicamente por las integrinas de las células óseas y constituye una de las vías por las que éstas actúan sobre la matriz extracelular.

Proteínas no colágenas: representan un 10% de las proteínas de la matriz osteoide y además de contribuir a tal estructura, intervienen o median fundamentalmente en la fisiología dinámica del hueso.

- **Glucoproteínas:**

Fosfatasa alcalina: producida por los osteoblastos es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos. Así, por un lado incrementa la concentración de iones fosfato necesarios para la mineralización de la matriz osteoide, y por otro anula la acción que los ésteres fosfóricos poseen sobre la mineralización.

- **Glucoproteínas con secuencia RGD (osteopontina, fibronectina, trombospondina, sialoproteínas óseas):** el tripéptido RGD (Arg-Gli-Asp) es reconocido por las integrinas, que actúan como receptores para proteínas con esa secuencia. El conjunto de las integrinas y las proteínas RGD constituyen un método de reconocimiento que permite el anclaje de las células óseas a la matriz osteoide y su migración sobre ella, base de los procesos de mineralización, remodelado y reparación de las lesiones óseas.

- **Proteoglicanos:** son macromoléculas producidas por los osteoblastos, con un núcleo proteico al que se enlazan oligosacáridos y cadenas de glucosaminoglucanos. Existen cuatro tipos de estas moléculas: condroitín-sulfato (presente en áreas de formación ósea, sirve para reservar espacio para el hueso maduro); hialuronano (interviene en la morfogénesis ósea); decorina y biglucano (moduladores de los efectos de ciertos factores de crecimiento) ⁽¹⁷⁾.

- **Proteínas con ácido gamma-carboxiglutámico:** se hallan dos proteínas: osteocalcina y proteína del osteoide con ácido gamma-carboxiglutámico. Estas proteínas producidas por los osteoblastos, median la mineralización de la matriz orgánica y facilitan la adhesión de las células óseas a la misma.

- **Factores de crecimiento (GFs):** son un conjunto de polipéptidos multifuncionales que transmiten mensajes para el control de la diferenciación, crecimiento y proliferación celulares. En el hueso se encuentran varios, que median los efectos que sobre la fisiología ósea ejercen tanto los factores mecánicos locales, como los sistémicos. Entre ellos destacan los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I y II) y los factores β transformadores del crecimiento (TGF- β). Los IGF son producidos por los osteoblastos y hepatocitos, y poseen receptores en los propios osteoblastos. En estas células, estimulan la síntesis de colágeno, y median la interacción osteoblasto-osteoclasto, vía por la que intervienen en el remodelado óseo. Los TGF- β son una familia de citoquinas producidas en numerosos tejidos como respuesta a una lesión, y desempeñan un importante papel en la reparación de estructuras dañadas.
- **Osteoproteínas morfogenéticas (BMP):** estructuralmente, están relacionadas con los TGF- β , con los que comparten una misma secuencia de aminoácidos. Se han identificado siete de estas BMP, alguna de ellas, como la osteogenina, con capacidad de estimular la síntesis de hueso nuevo.
- **Proteínas séricas retenidas en la matriz:** en el hueso existen cantidades significativas de hemoglobina, albúmina, inmunoglobulinas, α_1 -antitripsina, β_2 -microglobulina, α_2 -SH-glucoproteína y lipoproteína Apo A-1.

Tabla 1. Proteínas de la matriz osteoide ⁽¹⁵⁾

1. Colágeno tipo I (90%)
2. Proteínas no colágenas (10%):
 - a) Glucoproteínas:
 - Fosfatasa alcalina
 - Glucoproteínas con secuencia RGD (osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina, sialoproteínas óseas)
 - b) Proteoglucanos
 - c) Proteínas con ácido γ -carboxiglutámico (osteocalcina, proteína del osteoide con ácido γ -carboxiglutámico)
 - d) Factores de crecimiento
 - e) Osteoproteínas morfogenéticas (BMP)
 - f) Proteínas séricas retenidas en el hueso

2.1.2 MATRIZ INORGÁNICA O MINERALIZADA:

La matriz inorgánica también conocida como mineralizada, responde al 60-70% del hueso deshidratado. Contiene aproximadamente un 99% del calcio, un 85% del fósforo y alrededor de un 40% y 60% del sodio y del magnesio, respectivamente, que contiene el organismo ⁽¹⁴⁾.

El cristal de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) se caracteriza por su pequeño tamaño y su gran asimetría física y electrostática. Estas características le confieren una gran superficie por unidad de peso y, además, facilitan el depósito de agua e iones en su superficie. Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un tejido que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia ⁽¹⁸⁾.

2.1.3 CÉLULAS ÓSEAS:

2.1.3.1. Osteoblastos:

Derivan de células pluripotenciales de origen mesenquimatoso. La transformación de estas células embrionarias hasta osteoblastos (células finales que no sufren mitosis) se realiza gracias a la diferenciación celular que lleva a determinadas células osteoprogenitoras y a células inducibles osteoprogenitoras. Estas células originan osteoblastos, además de fibroblastos, condrocitos, adipocitos y células musculares, algunas de cuyas características fenotípicas son semejantes a las del osteoblasto⁽¹⁹⁾.

Al microscopio óptico, los osteoblastos maduros son células grandes de forma cuboidea, de 20-30 µm de diámetro mayor, con un núcleo ovalado y citoplasma basófilo azulado por su abundante ARN. Con el microscopio electrónico muestran un notable retículo endoplásmico rugoso, propio de las células que desarrollan una intensa síntesis proteica⁽¹⁵⁾.

El desarrollo de los osteoblastos está controlado por dos genes:

- a) El CBF A1 (*core-binding factor A1*), codificador del factor de transcripción específico de los progenitores del osteoblasto. Este factor regula la expresión de genes de proteínas específicas de esta célula, como osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I, sialoproteínas óseas y el ligando del receptor-activador del factor nuclear-κB (RANK-L).
- b) El gen *Ihh* (*Indian hedgehog*), igualmente necesario para el desarrollo embrionario del hueso y la actividad de los osteoblastos⁽²⁰⁾.

Los osteoblastos maduros son células polarizadas, dispuestas en forma de empalizada sobre la matriz orgánica que sintetizan y segregan, y actúan de forma coordinada. Tal coordinación entre osteoblastos se debe a la comunicación mediante uniones puntiformes que permiten el paso de mensajeros (Ca²⁺, citoquinas, prostaglandinas), o por el contacto entre

proteínas localizadas en la superficie. Así, en la membrana plasmática del osteoblastos se ha identificado un conjunto de glucoproteínas conocidas como integrinas, que sirven de enlace entre el citoesqueleto de una célula con otra o con la matriz extracelular⁽²¹⁾.

Los osteoblastos son células secretoras metabólicamente activas, que expresan proteínas como la osteocalcina y osteopontina, la osteonectina y otros proteoglicanos y factores señalizadores solubles (BMPs, TGF- β , IGF I y II, IL-1 y PDGF). La expresión de estos productos por parte de los osteoblastos ocurre durante la embriogénesis ósea y durante su mantenimiento (remodelación) y reparación. Las señales que dirigen la mineralización osteoide todavía no han sido identificadas. Es probable que la acumulación de proteínas a las cuales se une el calcio, sea el inicio del proceso de mineralización^(21,22).

Las acciones fisiológicas de los osteoblastos son:

- Producir la práctica totalidad de las proteínas que constituyen la matriz osteoide.
- Dirigir la organización o correcta disposición de esa matriz en forma de fibrillas y fibras, que permiten una gran resistencia.
- Contribuir a la adecuada mineralización de esa matriz orgánica, un proceso en el que es esencial la fosfatasa alcalina que producen los osteoblastos
- Mediar en los efectos que sobre los osteoclastos tienen las hormonas y factores estimulantes de la reabsorción ósea, desempeñando por tanto también un papel intermediario en la reabsorción ósea.

Aunque los osteoblastos están polarizados hacia el hueso, la liberación de las proteínas de la matriz osteoide no se limita a su polo basal, sino que muchos de ellos van quedando envueltos en tal matriz, convirtiéndose en osteocitos incluidos en las lagunas que se forman en ella. Junto con ese destino, los osteoblastos pueden derivar a osteocitos de superficie, también conocidos como células limitantes o de revestimiento. Ambos tipos de osteocitos poseen

receptores para paratohormona (PTH) y expresan *in vivo* ARNm de: actina- β , factores de transcripción c-fos y c-jun, colágeno y proteínas no colágenas, así como el ARNm del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I) ⁽²³⁾.

2.1.3.2. Osteocitos:

Son células relativamente inactivas, no se dividen ni secretan matriz, aunque su metabolismo es crucial para la viabilidad del hueso y para el mantenimiento de la homeostasis. Poseen forma estrellada, con numerosas y finas prolongaciones. Los osteocitos ocupan una pequeña laguna o cavidad dentro de la matriz que se denomina laguna ósea. Éstas están inerconectadas entre sí a través de una red de canaliculas, que garantizan la vitalidad del hueso. Estas canaliculas son las que permiten a los osteocitos interactuar a través de las hendiduras y permiten la transmisión de señales a los osteoblastos y de los osteoblastos a los osteocitos ⁽¹⁴⁾.

Precisamente, un papel fisiológico primordial de los osteocitos es la detección de estímulos mecánicos y variaciones de tensión y morfología del hueso, producidas por las cargas que soportan en su superficie, así como su traducción en el remodelado óseo. Cuando se produce la reabsorción del hueso por los osteoclastos, los osteocitos quedan fuera de las lagunas como células de revestimiento en reposo ⁽²⁴⁾.

Osteoblastos, osteocitos y osteoclastos juegan un papel muy importante en la regulación del calcio y en la homeostasis del hueso, que son los procesos fisiológicos fundamentales de la modelación y remodelación del hueso ⁽²⁵⁾.

2.1.3.3. Osteoclastos:

Embriológicamente, los osteoclastos proceden de células progenitoras hematopoyéticas denominadas “unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos” (CFU, del inglés *colony-forming units*), precursoras de monocitos y macrófagos. Estas células progenitoras alcanzan el hueso bien directamente desde la médula incluida en su seno, o desde la circulación ⁽²⁶⁾.

Las células precursoras de osteoclastos y éstos mismos expresan en su superficie el receptor de L-RANK producido por los osteoblastos, vía por la que, junto con citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el interferón γ y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), se diferencian y activan ⁽²⁷⁾.

Morfológicamente, son células multinucleadas de hasta 100 μm de diámetro con una media de unos 10 a 12 núcleos, ricas en vacuolas y mitocondrias y, como los osteoblastos, polarizadas. Con microscopía electrónica en una de las caras de su superficie muestran un sinfín de finísimos entrantes y salientes (borde en cepillo), donde se desarrollará la reabsorción ósea ⁽¹⁵⁾.

Existe una comunicación recíproca entre osteoblastos y osteoclastos que activa la dinámica de la reabsorción. Cuando los osteoblastos se dispersan en respuesta a la hormona paratifoidea PTH, los osteoclastos tienen la oportunidad de unirse a esa superficie osteoide mineralizada. Esta unión implica además la adhesión a la superficie de moléculas como integrinas y otras proteínas como la osteopontina, una fosfoproteína que afianza la unión de los osteoclastos al hueso. El perímetro de unión se conoce como “zona de unión” y dentro de esta zona se desarrolla el borde rugoso. Este límite rugoso constituye el territorio donde tienen lugar las roturas enzimáticas de la superficie del hueso.

2.2. Mecanismos de reabsorción ósea:

La reabsorción ósea es un proceso complejo que incluye la disolución de la fase mineral o inorgánica y la posterior degradación de las proteínas de la matriz ósea. Los mecanismos señalizadores responsables de la formación y activación de los osteoclastos no son del todo conocidos. Sí sabemos, que estas células sintetizan enzimas necesarias para la reabsorción ósea, y expresan una ATPasa bombadora de protones, un intercambiador bicarbonato/cloro, una fosfatasa ácida resistente a tartrato, catepsina K y la anhidrasa carbónica tipo II.

Los osteoclastos se adhieren a la superficie ósea mediante integrinas que reconocen específicamente a proteínas de la matriz osteoide. El área de sellado delimita un microespacio entre los osteoclastos y la superficie ósea. La desmineralización se produce mediante la acidificación de ese microespacio gracias a la acción de una ATPasa de H^+ localizada en la membrana del borde en cepillo. Para mantener el pH fisiológico en su seno, el osteoclasto dispone de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- en la cara opuesta al borde en cepillo y, en este borde, un canal de Cl^- acoplado a la ATPasa de H^+ . Como consecuencia de todo lo anterior, el osteoclasto secreta HCl en el microespacio subosteoclástico, con el consiguiente descenso del pH hasta 4.4 y la disolución del mineral. Esta disolución precede a la degradación de la matriz orgánica, llevada a cabo, a su vez, por proteasas como la catepsina K, secretada por los osteoclastos, y colagenasa por los osteoblastos. (28,29)

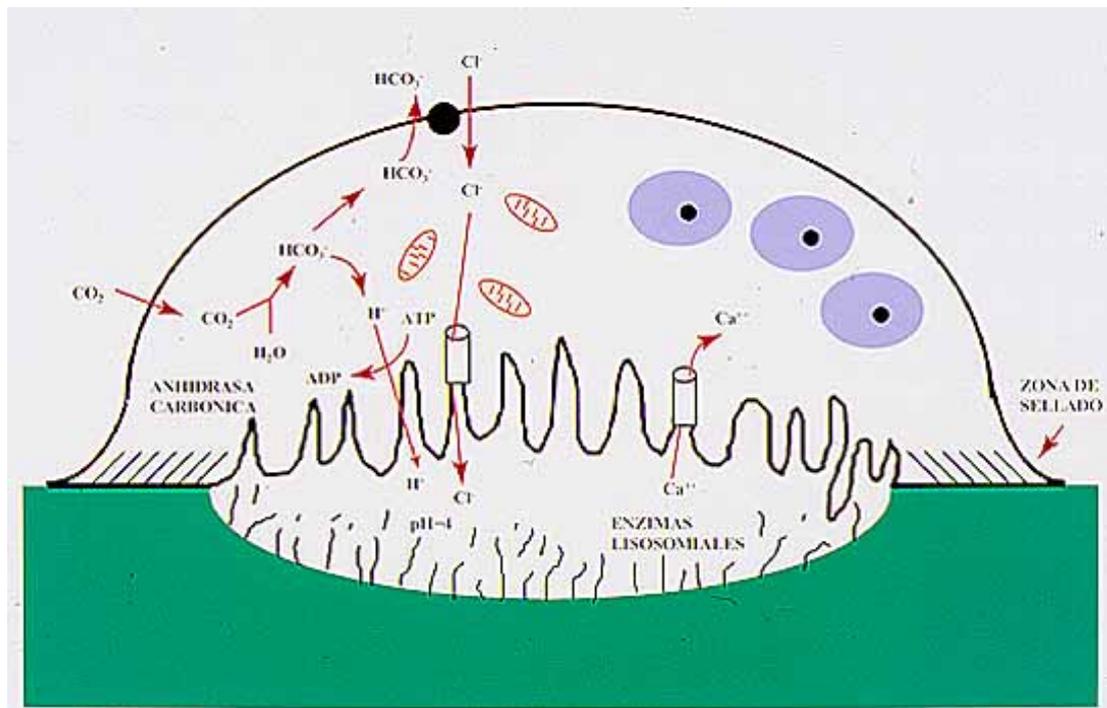


Fig. 7. Esquema de los mecanismos implicados en la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos. Reproducida de: Serrano S. Estructura y función del hueso normal. II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. www.conganat.org/.../018/images/figura10.jpg

2.3. Regulación de la reabsorción ósea:

El proceso de reabsorción ósea está controlado por una compleja interacción entre las células osteoblásticas y osteoclasticas (Fig.8).

Las células encargadas de este proceso son los osteoclastos, que expresan el ligando del activador del receptor de NF κ B (RANKL). El RANKL, tras unirse a su receptor (RANK) en los preosteoclastos, estimula de forma potente todos los aspectos de la actividad osteoclastica: aumenta la diferenciación, incrementa la actividad y disminuye la apoptosis de los osteoclastos. El RANKL es necesario y suficiente para la activación osteoclastica, requiriendo de otros factores permisivos. A la interacción RANKL-RANK se opone el señuelo del receptor osteoprotegerina (OPG), que evita la activación de los osteoclastos, ligando al RANKL e impidiendo su unión al receptor ⁽³⁰⁾. Para la osteoclastogénesis también es necesario el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), que pueden sintetizar los osteoblastos, que se liga al receptor c-fms, incrementando la replicación de los osteoclastos.

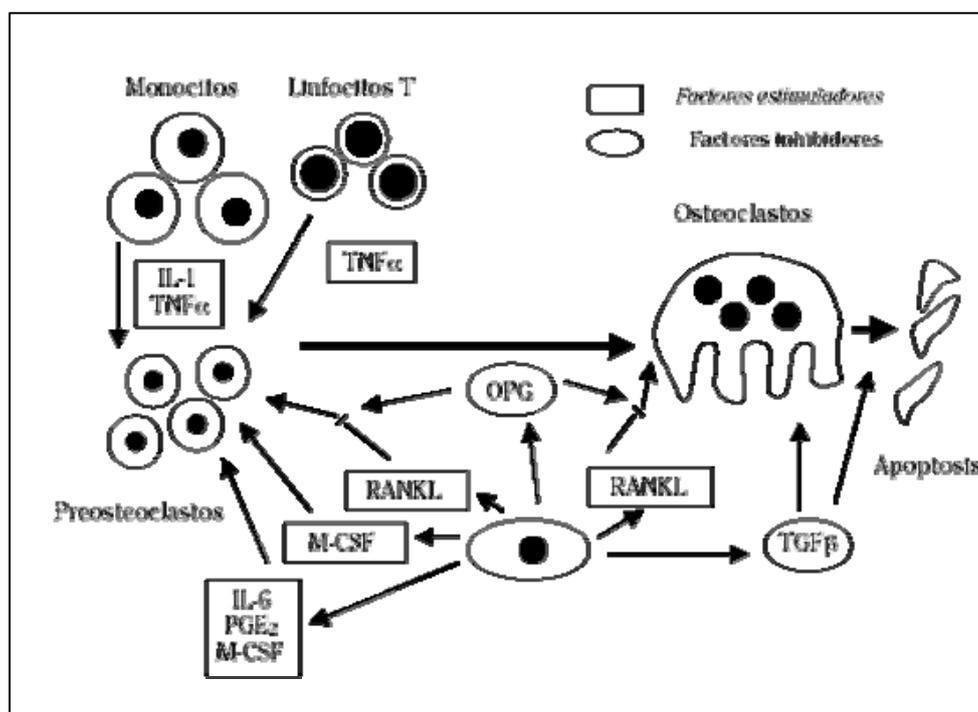


Fig. 8 Mecanismos de regulación de resorción ósea. (En: Lafita J. Fisiología y fisiopatología ósea. Anales Sis San Navarra, 2003; v.26 supl.3.)

El papel de las citoquinas sigue siendo controvertido, explicando la interacción de las células de la médula ósea con las células de la línea osteoblástica; así la Interleukina 1 (IL-1), Interleukina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF α) y prostaglandina E2 parecen incrementar la activación osteoclástica; sin embargo, el *transforming growth factor β* (TGF- β) reduciría la pérdida ósea, incrementando la apoptosis de los osteoclastos. Las hormonas sistémicas, que estimulan la resorción ósea, generalmente, no actúan directamente sobre los precursores de células osteoclásticas, sino sobre las células del estroma-osteoblásticas. Tanto la parathormona (PTH), 1,25 dihidroxi-vitamina D y las hormonas tiroideas (HT), incrementan la expresión de RANKL en este tipo celular, así como, en algunos casos, inhiben la síntesis de OPG con un efecto neto de incremento de la resorción ósea ⁽³¹⁾.

El efecto de los estrógenos parece ser indirecto, a través de la regulación de diversos mediadores, ya que su papel de control en el sistema RANKL-RANK, se lleva a cabo exclusivamente incrementando los niveles de OPG efecto que se potencia con su papel supresor sobre la síntesis de: IL-1, IL-6, PGE2, GM-CSF y TNF α , frenando la diferenciación y activación de los preosteoclastos. Los estrógenos también actúan sobre los osteoclastos ya activados, incrementando su apoptosis, tanto directamente como potenciando la síntesis de TGF β . ⁽³²⁾ La otra hormona que influye sobre la resorción ósea, la calcitonina, inhibe directamente la actividad osteoclástica, si bien de forma transitoria, por un fenómeno rápido de regulación (downregulation) de sus receptores, expresados sobre los osteoclastos.

Además de los mecanismos comentados, existen otros factores locales, que pueden condicionar el nivel de resorción ósea; por ejemplo, un nivel elevado de calcio, en el borde en cepillo de los osteoclastos, es capaz de inducir su apoptosis.

El proceso de reabsorción puede llegar a incrementar la fragilidad ósea, más allá de lo esperable simplemente por la disminución de la densidad mineral. En las espículas del hueso esponjoso se producen erosiones, durante la reabsorción así como aumento de porosidad en el hueso cortical; si el fenómeno

se repite varias veces en el mismo territorio, el resultado será de pérdida del armazón, sobre el que debería sustentarse el fenómeno acoplado de formación ósea, y también discontinuidad de las espículas. Además, el proceso de formación ósea requiere más tiempo que el de reabsorción, por lo que si el recambio óseo está muy acelerado, se compromete la mineralización, con posterior incremento de la fragilidad del hueso. Todo ello explicaría la asociación, independiente de otros factores, del riesgo de fracturas con una tasa elevada de reabsorción ósea (valorada por marcadores bioquímicos); así como que la inhibición terapéutica de la reabsorción puede conseguir resultados, en cuanto a la prevención de fracturas, superiores a los esperables por el mero aumento de la masa ósea ⁽³⁰⁾.

2.4. Remodelado óseo:

La masa ósea total alcanza el máximo entre los 20 y 30 años. Posteriormente, se mantienen las mismas tasas de formación y reabsorción hasta los 40 a 50 años de edad, momento a partir del cual la reabsorción comienza a superar a la formación y la masa ósea total desciende lentamente. El proceso de recambio óseo continuo en el adulto, conocido como remodelado óseo, afecta al 10% de la masa ósea total cada año ⁽³³⁾.

Este remodelado está ligado a las superficies óseas y comprende una secuencia ordenada de acciones celulares. De tal manera, en puntos determinados de la superficie cortical o trabecular en reposo se agrupan en primer lugar células hematopoyéticas precursoras que se diferencian “*in situ*” a osteoclastos. Poco después, estas células se activan y proceden a la reabsorción ósea ^(34,35). Éstos comienzan a reabsorber el hueso, de forma que a lo largo de unas dos semanas labran una pequeña cavidad que se denomina Lagunas de Howship.

Al finalizar esta fase de reabsorción de hueso, la cavidad labrada por los osteoclastos es tapizada por células mononucleares de naturaleza no bien conocida. Es la llamada fase de inversión. Después se reclutan precursores de osteoblastos, que proliferan y se diferencian. Los osteoblastos se disponen en

una monocapa y comienzan a sintetizar osteoide que va rellenando el hueco abierto por los osteoclastos. Es la fase de formación de hueso, que se prolonga durante dos a cuatro meses. La mineralización de las láminas de osteoide se va produciendo según se depositan, pero con un retraso de unas dos semanas. Al final del proceso, el resultado es que un pequeño volumen de hueso viejo ha sido renovado por hueso nuevo ⁽³⁶⁾.

Fases del remodelado óseo ⁽³⁶⁾:

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases:

1. Fase quiescente: Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

2. Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos.

3. Fase de reabsorción: Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).

4. Fase de formación: Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la

diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

1.5. Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular.

Y de nuevo empieza fase quiescente o de descanso.

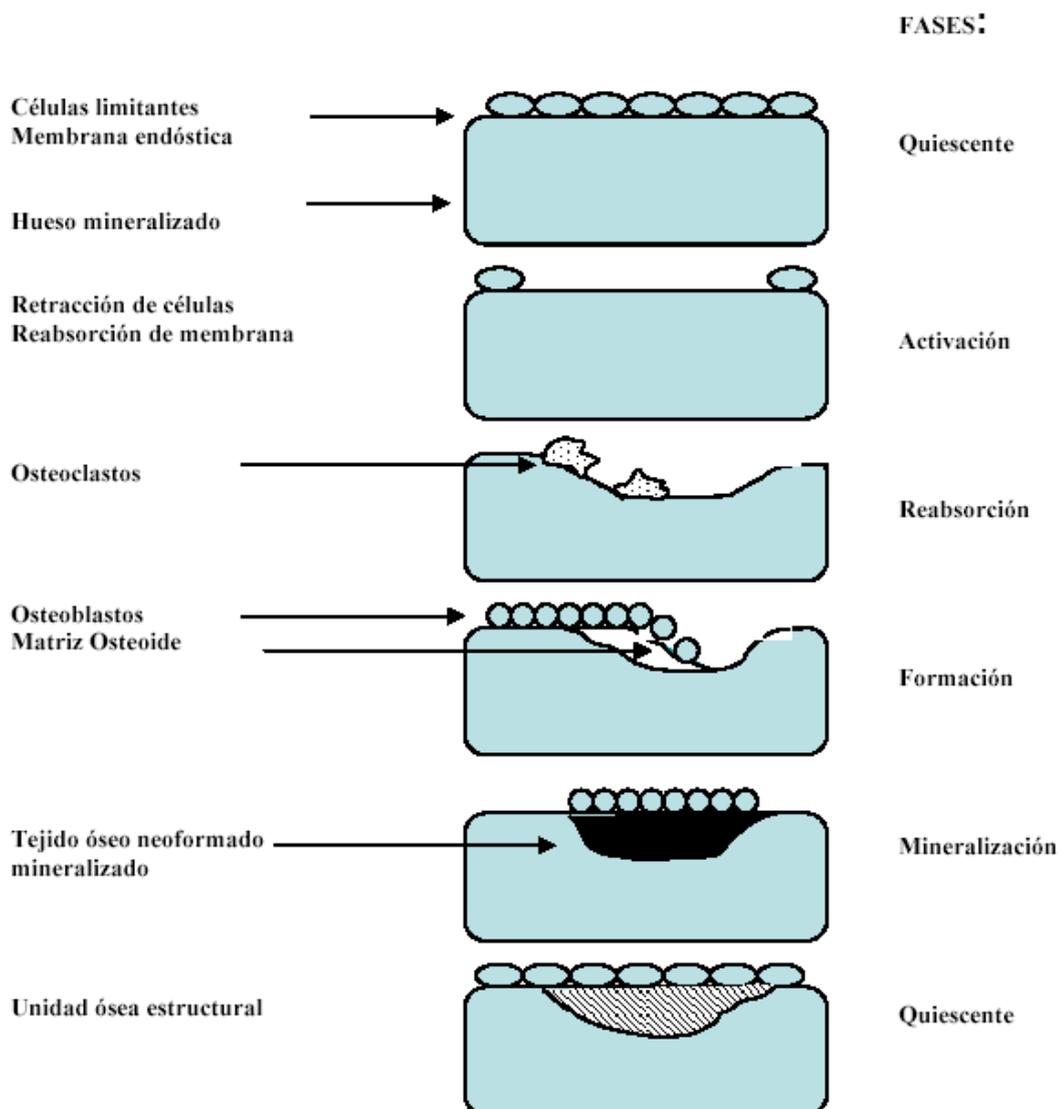


Fig. 9. Fases de Remodelado Óseo. Modificado de: Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 2001;81:419-47.

Este remodelado se produce a lo largo de toda la vida, y está influido por ciertos factores reguladores.

2.5. Factores que regulan el remodelado óseo:

2.5.1. **PARATHORMONA (PTH):** Estimula el agrupamiento y actividad de los osteoclastos, favoreciendo la reabsorción en el que debe ser su principal efecto sobre el hueso. Además, la PTH posee una acción estimuladora de la formación ósea mediada por factores de crecimiento, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β ⁽³⁷⁾. Este doble efecto de reabsorción y formación se explicaría porque la PTH administrada de forma continua estimularía la reabsorción ósea a través de la síntesis de un factor favorecedor de la osteoclastogénesis (RANKL) por parte de las células osteoblásticas, mientras que a dosis intermitentes estimularía la formación de hueso, asociado a un incremento de los factores de crecimiento mencionados anteriormente y a una disminución de la apoptosis de los osteoblastos.

2.5.2. **CALCITONINA (CT):** Inhibe la proliferación de las células precursoras de osteoclastos y, mediante receptores en éstos, disminuye la reabsorción ósea. Es discutible, que tal efecto tenga importancia en el remodelado fisiológico, ya que los osteoclastos escapan pronto del bloqueo de su acción por la CT.

2.5.3. **1,25(OH)₂ o VITAMINA D:** Hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización ósea. Los metabolitos activos de la vitamina D son necesarios para la mineralización normal de la matriz osteoide y para el desarrollo fisiológico del esqueleto, y simultáneamente poseen un efecto estimulador de la reabsorción ósea por los osteoclastos ⁽³⁸⁾.

2.5.4. **ESTRÓGENOS:** Los estrógenos, tanto como, los andrógenos y la progesterona tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, bien directamente, merced a receptores en osteoblastos, o mediante la síntesis de factores locales de crecimiento estimulantes de la acción de esas células. Los estrógenos tienen

un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro lado, disminuyen la reabsorción. Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Investigaciones recientes han comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG), proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción ⁽³⁹⁾, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Es por esto que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis.

2.5.5. GLUCOCORTICOIDES: Inhiben la producción de IGF-I por los osteoblastos y su síntesis de matriz osteoide. A dosis altas tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa1, que son factores críticos para la osteoblastogénesis ⁽⁴⁰⁾. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica ⁽⁴¹⁾.

2.5.6. HORMONA DE CRECIMIENTO (GH): Estimula la producción de colágeno y proteínas no colágenas por los osteoblastos; y, además, al estimular la síntesis de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF) por el hígado y los propios osteoblastos, favorece la diferenciación de los preosteoblastos y la proliferación de osteoblastos ⁽⁴²⁾.

2.5.7. IGF I y II (*Insulin-like Growth Factors I and II*): Incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno ⁽⁷⁾. Circulan unidos a proteínas de unión (IGFBP de *IGF-binding protein*), que a su vez pueden ejercer efectos estimulantes o inhibidores sobre el hueso. Los IGFs están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Asimismo, IGF-I y II, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo ⁽⁹⁾. El IGF-II es el factor de crecimiento más abundante de la

matriz ósea, es importante durante la embriogénesis, pero sus efectos sobre el esqueleto ya desarrollado actualmente se desconocen ⁽¹⁰⁾.

2.5.8. CITOQUINAS: Son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas que juegan un papel importante en múltiples funciones celulares, como en la respuesta inmunológica, la inflamación y la hematopoyesis, con un efecto autocrino y paracrino. En el hueso son importantes las siguientes:

- Interleuquina 1 (IL-1): Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los preosteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos⁽⁴³⁾. En realidad son tres moléculas diferentes relacionadas: IL-1 α , IL-1 β y antagonista del receptor de IL-1, siendo esta última inhibidora del efecto de las dos primeras. Su acción sobre la reabsorción puede ser directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas.
- Interleuquina 6 (IL-6): Estimula la reabsorción ósea y parece implicada en la patogenia de la enfermedad de Paget ⁽⁴⁴⁾. Se cree que juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25(OH)₂D₃.
- Interleuquina 11 (IL-11): Se produce en la médula ósea e induce la osteoclastogénesis.
- Prostaglandinas (PG): *In vitro* favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE₂, pero también la PGE₁, PGG₂, PGI₂ y PGH₂ ⁽⁴⁵⁾. Estudios *in vivo*, midiendo los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular, han demostrado su participación en la destrucción ósea que tiene lugar en la enfermedad periodontal ⁽⁴⁶⁾.

2.5.9. **PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS ÓSEAS (BMPs: *Bone Morphogenetic Proteins*):** Las proteínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF- β . Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago.

Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica ⁽⁴⁹⁾. Canalis *et al.* ⁽⁴⁷⁾ creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.

2.6. Osteointegración y Biología Ósea en Implantología

Oral:

Las enormes posibilidades terapéuticas que ofrece han hecho de la implantología oral la rama de la Odontología que más se ha desarrollado en los últimos 15 años.

Un requisito imprescindible para el éxito del tratamiento implantológico es la unión firme, estable y duradera del implante dental al sustrato óseo que lo engloba, para luego poder construir sobre él una restauración protésica. En este sentido, Branemark (1965) fue el primero en definir el concepto de osteointegración como: “*La conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional*” ⁽⁴⁸⁾.

La osteointegración requiere la formación de hueso nuevo alrededor del implante, proceso resultante de la remodelación en el interior del tejido óseo. El proceso lo inician los osteoclastos, que son las células responsables de reabsorber la zona necrótica originada por el fresado óseo durante la preparación del lecho receptor óseo. Junto a ellos, la neoformación vascular aportará los elementos celulares, los osteoblastos, que crearán hueso nuevo capaz de interactuar con la capa de óxido de titanio del implante para integrar

biológicamente al mismo. Los osteoblastos se diferenciarán posteriormente a osteocitos incluidos en la matriz ósea mineralizada.

Si consideramos ultraestructuralmente la interfase hueso-implante debemos referirnos al concepto de biointegración, que es la unión bioquímica directa entre el hueso vivo y la superficie del implante, demostrable a través de microscopía electrónica, independientemente de cualquier mecanismo mecánico de interunión. Así, el espacio existente entre el tejido óseo mineralizado y la capa de plasma de titanio del implante no es mayor de 10 Å y aparece lleno de un material matriz, los proteoglicanos ⁽⁴⁹⁾. Una red de colágeno rodea los osteocitos y se inserta en la capa de glucoproteínas, que se fusiona con la capa de óxido de titanio. Se cree que el óxido de titanio del implante induce la formación de glucosaminoglucanos sulfatados ⁽⁵⁰⁾. Las trabéculas óseas crecen acercándose al implante y contactando con la capa de plasma. Por ellas llegan los vasos que aportan nutrición, elementos celulares para la remodelación y rodean el implante; los fibroblastos y osteoblastos aumentan y al acercarse al implante se unen a la capa de óxido. Forman sustancia fundamental que llena los espacios trabeculares y se fusiona con la capa de óxido de titanio. Por tanto, y en contra de lo que se creía hasta hace unos años, la interfase implante-tejidos orales es una zona dinámica sometida a una intensa actividad remodeladora por parte de las células óseas y la matriz extracelular ⁽⁵¹⁾.

Aunque hoy en día los nuevos diseños y tratamientos de superficie de los implantes están permitiendo en algunos casos reducir los tiempos de carga, se establece de forma general un periodo de osteointegración de tres meses en mandíbula, y de seis meses en el maxilar superior.

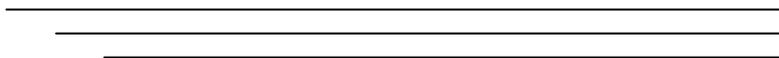
2.7. Papel de la GH en el remodelado óseo:

En 1969 se demostró por primera vez un incremento en la masa ósea después del tratamiento sistémico con GH en perros ⁽⁵²⁾, así como un incremento en la densidad mineral ósea en personas mayores de 60 años, después de seis meses en tratamiento con GH ⁽⁵³⁾. Brixen *et al.* demostraron que

la GH era capaz de estimular el recambio óseo, aumentando los marcadores de reabsorción y formación óseas en sujetos sanos, y los valores de osteocalcina, que es una proteína cuya concentración en suero refleja la actividad osteoblástica, aumentaban durante seis meses, después de una semana de tratamiento con GH ⁽⁵⁴⁾.

La GH sistémica ha sido usada para estimular de forma experimental la reparación de fracturas óseas ratas viejas y jóvenes, mostrando un incremento de un 400% en las propiedades biomecánicas cuando se comparó con un grupo control no tratado ^(55,56). Recientes estudios han mostrado que la GH puede también tener un efecto local, así Guicheux *et al.* observaron que la administración local de GH fue capaz de mejorar el proceso de sustitución de biomateriales por hueso a través de la aceleración del proceso de remodelado óseo, estimulando la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina ⁽⁵⁷⁾.

OBJETIVOS



OBJETIVOS:

Los objetivos de nuestra investigación, realizada en perros de raza Beagle de experimentación animal, fueron:

1. Evaluar el efecto de la aplicación tópica de hormona de crecimiento en el proceso de osteointegración de implantes dentales a los 14 días de su colocación.

2. Valorar la posible aplicación clínica de la hormona de crecimiento en los procesos de osteointegración en la cavidad oral.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS:

1. Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento:

Tras obtener la aprobación por parte del Comité de Ética de la Universidad de Granada, nuestro estudio se realizó en 12 perros macho de raza *Beagle*, procedentes de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba (España), que se estabularon en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada (España). Los animales, que recibieron alimentación *ad libitum* con dieta sólida a base de pienso y agua y cuyos estabularios fueron cuidados diariamente, permanecieron en el animalario hasta la edad de estudio, que comenzó a los 14 meses.

El estudio siguió en todo momento los principios éticos en investigación y docencia con modelos animales definidos internacionalmente ⁽⁵⁸⁾ y aceptados por la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), dentro de la legislación básica actual: REAL DECRETO 223/1988, de 14 de Marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos ⁽⁵⁹⁾.

1.1. EXODONCIAS:

Con la finalidad de la colocación posterior de implantes dentales, entre los 14 y 16 meses de edad se realizaron las exodoncias de premolares y molares superiores e inferiores a los 12 perros bajo anestesia general. Se conservó el sector anterior (superior e inferior) de canino a canino para que los perros pudieran mantener una mínima función masticatoria.

Todas las intervenciones se realizaron bajo la supervisión del Veterinario del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Para la inducción anestésica se utilizó la siguiente medicación (el cálculo de las dosis de los fármacos se hizo en función del peso de los perros, entre 16 y 18 Kg aproximadamente):

- Calmo Neosan® (Maleato de Acepromazina): 0.5-1 mg/Kg peso (1-2 ml/10 Kg peso) vía i.m., como tranquilizante 15 minutos antes de la anestesia general.
- Anestesia general, compuesta de:
 - Imalgene® (Ketamina + Clorbutol): 5-8 mg/Kg peso vía i.v..
 - Calmo-Neosan®, como coadyuvante del anestésico a la dosis arriba indicada.
- Atropina 0.05 mg/Kg peso vía s.c., para disminuir las secreciones.

Como medicación antiinflamatoria/analgésica y antimicrobiana se utilizó:

- Voren Antiinflamatorio® (Dexametasona isonicotinato): 1-2 ml vía i.m..
- Bivamox Antibiótico® (Amoxicilina): 2 ml vía i.m..

El antibiótico y el antiinflamatorio se administraron al terminar la intervención quirúrgica y posteriormente cada 2 días durante un total de 4 días, para prevenir la infección e inflamación postoperatorias, como establecen los comités de ética de experimentación animal.

Durante todo el procedimiento quirúrgico la vía i.v. del perro fue mantenida con un suero glucosalino (250 cc.) que permitía la administración de la medicación anteriormente referida. El suero era transfundido en su totalidad después de terminar la intervención para facilitar la hidratación y recuperación postquirúrgica del animal.

Después de la intervención quirúrgica se trasladaba a los perros, aún bajo los efectos de la anestesia general, del quirófano a su estabulario para que, bajo supervisión veterinaria, se recuperasen progresivamente de la operación.

Durante los días posteriores se revisaron periódicamente los perros, sobre todo el estado de las heridas postexodoncias, cuidado y limpieza de las mismas para evitar infecciones, así como la evolución del estado general de los animales.

1.2. COLOCACIÓN DE LOS IMPLANTES.

Tras dos meses como tiempo de espera para la cicatrización y regeneración del hueso alveolar, se procedió a la colocación de los implantes dentales, aproximadamente entre los 16 y 18 meses de edad de los perros. La medicación utilizada fue similar a la descrita en la fase quirúrgica anterior.

En cada mandíbula se colocaron ocho implantes de 3,25 mm de diámetro y 10 mm de longitud. En este trabajo fueron evaluados dos implantes en cada lado de la mandíbula (cuatro implantes en total). Los cuatro implantes restantes fueron utilizados para otra investigación.

Los cuatro implantes de nuestro estudio fueron asignados de forma aleatoria en localizaciones mesiales y distales de cada hemimandíbula.

Antes de la colocación del implante se aplicó al lecho óseo receptor de cada hemimandíbula 4UI de rhGH (Saizen®; Serono Laboratories, Madrid, España) en forma de polvo liofilizado.

En los lechos óseos donde se colocaron los implantes control no se aplicó ningún tratamiento tópico.



Fig. 10. Implantes colocados en mandíbula de perro *Beagle*.

Técnica Quirúrgica.

El protocolo seguido correspondió a la técnica convencional de colocación de implantes oseointegrados⁽⁶⁰⁾, cuyos pasos se describen a continuación:

- Incisión crestal con un bisturí con hoja del número 15, que se extendió a lo largo del cuerpo mandibular desde distal del canino hasta 15 ó 20 mm hacia distal del punto de colocación del último implante.
- Disección roma mediante el uso de periostotomos de Molt y Williger. Se procede a levantar un colgajo de espesor total, de amplitud suficiente para tener acceso a la cresta edéntula, incluyendo las corticales vestibular y lingual; de esta forma se verifica la integridad del reborde alveolar después de las exodoncias.
- Elaboración del lecho receptor de los implantes. Se realiza en el reborde óseo un lecho de morfología y dimensiones similares al implante a colocar. Utilizamos un micromotor (CHIROPRO 980. CA 100121. Bien Air®) con irrigación externa con suero fisiológico para evitar el sobrecalentamiento y necrosis del tejido óseo, y fresas de osteotomía de diámetros progresivamente mayores para realizar las preparaciones mediante un fresado secuencial (kit de fijación de implantes *Implant Microdent System*):
 - Fresa de marcaje o piloto, recta, de pequeño diámetro (1-1.5 mm). Es la primera fresa utilizada una vez que disponemos del campo operatorio correctamente preparado. Nos sirve para marcar el lugar de colocación e iniciar la preparación a través de la cortical y de los primeros milímetros de hueso esponjoso.
 - Fresa intermedia, de diámetro inferior al de la fresa definitiva. Se utiliza para ampliar la osteotomía, ensanchando el diámetro de la preparación iniciada con la fresa de marcaje, hasta la longitud definitiva (10 mm) preestablecida para la fijación.
 - Fresa de avellanado. Sirve para preparar los primeros milímetros del nealveolo, en los que se alojará la porción más cervical del implante.
 - Fresa final, de longitud y diámetro definitivos.

- Aplicación tópica de GH en el lecho óseo receptor según el procedimiento escrito anteriormente.
- En los lechos óseos donde se colocaron los implantes control no se aplicó rhGH.
- Colocación de los implantes. Los implantes utilizados fueron implantes roscados (*Implant Microdent System*, plataforma diámetro 5.60 mm y diámetro de núcleo 3.25 mm, longitud 10.00 mm - MK 555010. Barcelona, España). Los implantes fueron llevados a la preparación para proceder al roscado de forma manual, y terminar de forma mecánica mediante llave de presión o carraca.
- El espacio mínimo que se dejó entre cada implante fue de 5 mm, para evitar
- Colocación del tornillo de cierre o de cicatrización.
- Sutura con seda reabsorbible (Dexon 3-0, Davis & Genk, NJ, USA) y administración del remanente de suero glucosalino utilizado durante la intervención.

1.3. SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DE LA MANDÍBULA.

En la tercera y última fase de experimentación animal los perros fueron sacrificados a las dos semanas de la intervención implantológica con el objetivo de valorar la osteointegración en dicho periodo de tiempo.

Para la eutanasia de los animales se siguió la siguiente pauta farmacológica:

- CalmoNeosan® (maleato de acepromazina): 2,5 -3 cc. vía i.m. + Imalgene 1000® (ketamina + clorbutol): 2 cc. vía i.m., como premedicación sedante.

- Pentobarbital sódico (Dolethal®, Vétoquinol, Buckingham, UK): 3 cc. vía i.v.

Una vez constatada por el veterinario la muerte del perro, procedimos a la disección y extracción de la mandíbula para llevar a cabo el estudio histomorfométrico. Para ello, utilizando un bisturí con hoja del número 15 y un periostotomo de Molt, se diseccionaron los tejidos orales adheridos al cuerpo mandibular. Primero se diseccionó la mucosa y musculatura de la cara vestibular, y después la mucosa lingual, tejidos y músculos del suelo de la boca. Posteriormente, con la ayuda de un micromotor (Microprocesor Vmax Volvere NE 120®, Nakanishi INC.) y una fresa de osteotomía, con irrigación con suero salino, realizamos dos cortes transversales en ambos lados del cuerpo mandibular, con un margen distal de aproximadamente 10 ó 15 mm con respecto a los implantes colocados más distales, y se procedió de forma cuidadosa a la extracción de la mandíbula. Ésta se introdujo en un recipiente de plástico herméticamente cerrado con formaldehído 3.7-4.0%, tamponado a pH=7 y estabilizado con metanol DC (Panreac DC ref. 252931.1214).

Las mandíbulas en formaldehído se enviaron al Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela para realizar el análisis histomorfométrico.

2. Obtención y preparación de las muestras:

2.1. PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO ÓSEO.

Tanto la preparación como el análisis histológico de las muestras de tejido óseo fueron realizados en el Laboratorio de Implantes de la Unidad de Cirugía, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela.

Las muestras fueron procesadas para su estudio utilizando las técnicas de inclusión en metacrilato descritas por Donath ⁽⁶¹⁾, realizando los pasos que siguen:

Fijación:

Se realizó mediante inmersión de los bloques en formol al 10% durante un mínimo de dos semanas debido al gran tamaño del fragmento óseo.

Deshidratación:

Se realizó mediante pases sucesivos de los segmentos óseos por alcoholes de distinta concentración bajo agitación constante, como se indica a continuación:

- 70 % alcohol durante tres días.
- 80 % alcohol durante tres días.
- 96 % alcohol durante tres días.
- 100 % alcohol durante tres días.
- 100 % alcohol durante tres días.

Infiltración:

La infiltración plástica se realizó mezclando glicolmetacrilato (**Technovit 7200**[®], VLC - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) y peróxido de benzoilo (**BPO**[®]: Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) al 1% con alcohol etílico a distintas concentraciones, finalizando con dos infiltraciones de glicolmetacrilato puro, bajo agitación constante, según el siguiente procedimiento:

- Technovit 7200[®] + BPO: alcohol | **(30:70)** durante tres días.
- Technovit 7200[®] + BPO: alcohol | **(50:50)** durante tres días.

- Technovit 7200® + BPO: alcohol | **(70:30)** durante tres días.
- Technovit 7200® + BPO | **(100)** durante tres días.
- Technovit 7200® + BPO | **(100)** durante tres días en vacío.

Inclusión y polimerización:

Para llevar a cabo la inclusión se introdujeron las muestras de tejido en unos moldes de polietileno que posteriormente se llenaron con resina (Technovit 7200®) bajo el efecto del vacío.

La polimerización tuvo lugar en dos pasos:

- **Paso 1:** usando una luz de baja intensidad (manteniendo los moldes a una temperatura por debajo de 40° C, para que la resina se polimerizara extensamente). Este paso dura cuatro horas.
- **Paso 2:** usando una luz azul de gran intensidad, de forma que el metacrilato que ha sido incluido dentro del tejido también resulte completamente polimerizado. Este paso tiene una duración de doce horas, debido al gran grosor de nuestras muestras.

Por último, permanecieron en la estufa durante 24 horas para que el BPO terminara su proceso de polimerización.

Preparación del bloque para obtener una superficie paralela:

Una vez polimerizado, se extrajo el bloque del molde. El siguiente paso fue realizar un corte preliminar para aproximar el área de interés más cerca de la superficie del bloque. Esto se realizó con la ayuda de una sierra de banda (Exakt 300), e irrigando para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, que deterioraría los tejidos que rodean al implante. Después se procede a realizar una radiografía del espécimen en dos proyecciones para hacer un corte del implante por la mitad. Una vez cortado por la mitad los

bloques se montaron en una lámina acrílica con ayuda de una resina (**Technovit 4000**[®] - Heraus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) mediante el empleo de una prensa de pegado y una bomba de vacío, que sujeta el porta a la parte superior de la prensa. La resina se extendió por la parte de atrás del bloque, de manera que la parte que va a ser examinada contacte con la parte de debajo de la prensa de pegado. Cuando la polimerización finalizó el bloque estuvo listo para ser pulido.

Preparación de la superficie de interés:

El siguiente paso fue el pulido de la muestra por la superficie de interés con la ayuda de papeles abrasivos del número 1200. Tras realizar esta práctica, y con la ayuda de la prensa de fotopegado y una resina específica (**Technovit 7210**[®] - Heraus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) la cara a estudiar se pegó en el porta definitivo. Posteriormente, utilizando una sierra de banda (Exakt 400, System, Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania) y un portamuestra de vacío, se realizó un corte preliminar obteniendo una sección fina de 200 micras aproximadamente. Esta sección fue sometida a un microdesgaste (Exakt-Micro Grinding System[®], Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania) y pulido con papeles de carburo de silicio de 1200 y 4000.

Como resultado final se obtuvieron secciones de aproximadamente 70 micras de espesor.

Tinciones:

TABLA 2. Tinción de LÉVAI LACZCÓ.

TINCIÓN DE LÉVAI LACZCÓ	
<p>Procedimiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sumergimiento en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% durante 5 minutos con movimiento constante. 2. Lavado con agua corriente dos veces. 3. Descalcificación de la superficie con ácido acético (CH₃COOH) durante 1 minuto. 4. Lavado con agua corriente dos veces. 5. Sumergimiento en la Solución A durante 20 minutos 6. Lavado con agua corriente dos veces 7. Sumergimiento en “Pararosanilina” durante 5 segundos. Los cortes se deben sumergir individualmente en esta tinción. 8. Lavado con agua corriente y secado. 	
Solución A	Materiales
<p>Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na₂CO₃ (1%).</p> <p>Las soluciones deben ser filtradas antes de su uso.</p>	<p>➤ Solución A:</p> <p>Azur II (Merck Art. No. 9211) al 1% en agua destilada.</p> <p>Azul de metileno (Merck Art. No. 1283) a 1% en agua destilada.</p> <p>Na₂CO₃ (Merck Art. No. 6392) a 1% en agua destilada.</p> <p>➤ Solución B:</p> <p>Pararosanilina (Sigma Art. No. 1528) a 1% en agua destilada.</p>

2.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.

La histomorfometría es una valoración cuantitativa que permite la medición bidimensional (anchura, longitud, perímetro y área) y tridimensional (volumen, anchura y superficie) en diferentes tejidos vivos, entre ellos el tejido óseo. La evaluación histológica del hueso se ha visto limitada durante años por las dificultades técnicas, de tal manera que antes de 1960 se realizaban únicamente técnicas de decalcificación que permitían obtener un tejido lo suficientemente blando para incluirlo en parafina. Sin embargo, esta técnica presentaba una serie de inconvenientes ⁽⁶²⁾:

- No distinguía el hueso mineralizado del no mineralizado.
- En la mayoría de los casos se producían fenómenos de retracción de la interfase hueso/médula ósea que dificultaban la evaluación de las células que intervienen en el remodelado.
- Imposibilitaba el estudio de la dinámica ósea mediante marcaje con tetraciclinas.

Con el desarrollo técnico de medios duros de inclusión (monómeros plásticos) y de microtomos especiales se ha permitido cortar el hueso sin descalcificar y de esta manera realizar nuevos estudios.

Los parámetros histomorfométricos resultan de relacionar entre sí una serie de recuentos y mediciones efectuadas en el tejido óseo, permitiéndonos definir cuantitativamente las características estructurales y funcionales del hueso en condiciones normales, patológicas o experimentales⁽⁶³⁾.

En nuestro estudio, para el análisis histomorfométrico se procedió a la captura de las imágenes con un microscopio óptico (Olympus CH30, Nagano, Japón), al que se le acopló una cámara digital (Olympus DP12,

Nagano, Japón), de este modo, las imágenes se magnificaron 40X. La captura de las imágenes se realizó con un objetivo de cuatro aumentos, y utilizando filtros para polarizar la luz. El análisis de imágenes se realizó con el programa informático Microimage 4.0® (Media cybernetics, Maryland, USA).

El análisis histomorfométrico fue realizado por el mismo investigador, que desconocía a qué grupo (experimental o control) pertenecía cada muestra.

Los parámetros histomorfométricos analizados en nuestro estudio fueron los siguientes (Fig 11) ⁽⁶⁴⁾:

➡ **BIC (*Bone-to-implant contact ratio*):**

El parámetro BIC corresponde al porcentaje de integración o ratio de contacto óseo, y se define como el hueso en contacto directo con el implante en relación al perímetro total de éste. Se empieza la medida en el hombro de un lado del implante hasta el hombro del lado contrario. Se expresa en forma de porcentaje y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{BIC} = \left(\frac{\text{longitud superficie del implante en contacto directo con hueso}}{\text{longitud total del implante}} \right) \times 100$$

➡ **HUESO PERIIMPLANTARIO TOTAL (*Periimplant bone area*):**

Para determinar la densidad ósea alrededor del implante se utilizaron en la histomorfometría pequeños rectángulos formados por una línea que une los picos de las roscas de los implantes, y a una distancia de un milímetro de éstas (dimensiones aproximadas del rectángulo: 1 mm x 1,2 mm) (Fig.11); de esta manera, el hueso periimplantario total se define como el área de hueso dentro de los rectángulos dividida entre el área total de tejido en el interior de los mismos (aproximadamente 1.247.227 micras cuadradas) (x 100). En cada implante se determinaron ocho rectángulos y se

calcularon la media y el total de las áreas. El resultado final es la media de los porcentajes de hueso de todos los rectángulos alrededor del implante.

➡ **HUESO INTERROSCA (*Inter-thread bone area*):**

Se define como el área de hueso dentro de las roscas del implante dividida entre el área total de tejido comprendida en las mismas (el área de cada triángulo interroscas tiene aproximadamente una superficie de 155.993,40 micras cuadradas) (Fig. 11). El resultado final se multiplica por 100 y se expresa, como en las variables anteriores, en forma de porcentaje.

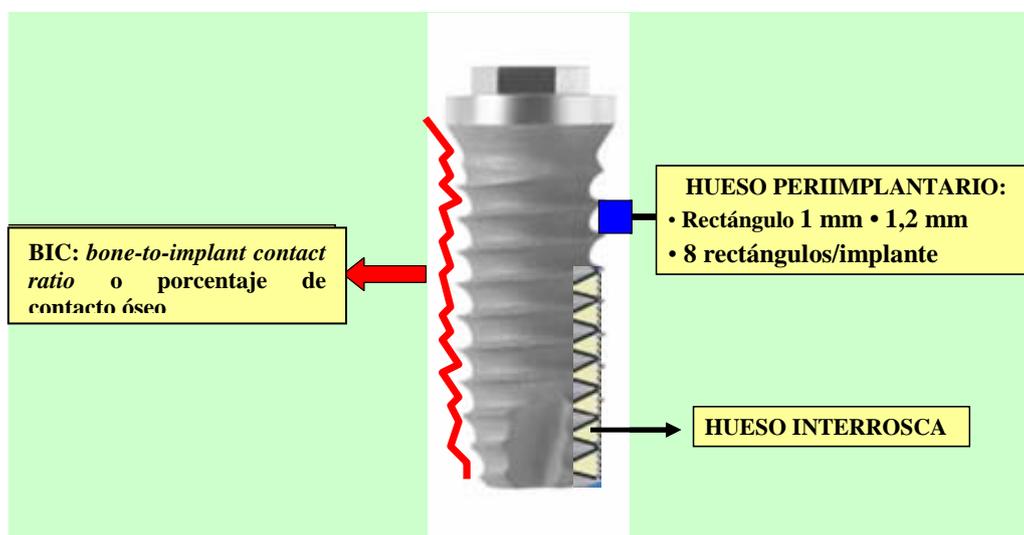


Figura 11. Representación de los parámetros de osteointegración determinados en el estudio histomorfométrico

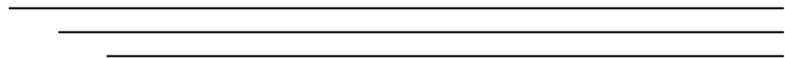
➡ **PORCENTAJE DE NEOFORMACIÓN ÓSEA.**

Se define como el área de hueso nuevo formado tras la colocación del implante. Puede ser consecuencia del proceso de remodelado del hueso ya existente, o de la formación de nueva matriz osteoide tras la diferenciación de células preosteoblásticas, que llegan a través de los vasos sanguíneos al lecho alveolar. El hueso neoformado se localiza fundamentalmente entre las roscas de los implantes, aunque también lo encontramos en la zona periimplantaria.

3. Análisis Estadístico:

Todos los datos se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (SEM). Para analizar las diferencias entre las distintas variables se utilizó el test de la *t* de Student (y en su caso el test aproximado de Welch) para muestras apareadas o independientes según procedió. Los cálculos se realizaron con la versión 11.0 del programa SPSS (Chicago, IL, Estados Unidos) con licencia de la Universidad de Granada (Nº Licencia: 7837432). El nivel de significación estadística se estableció en $P < 0.05$.

RESULTADOS



1. RESULTADOS:

Los resultados obtenidos en los distintos parámetros histomorfométricos de osteointegración se describen en la tabla 3.

TABLA 3. Parámetros histomorfométricos de la osteointegración en los implantes control y los implantes tratados con GH tópica, dos semanas después de su colocación.

Los datos se expresaron como valor medio \pm error estándar de la media (SEM) *** $P < 0.0001$ y ** $P < 0.001$ vs. implantes control. N.S: Estadísticamente no significativo.

PARÁMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS	IMPLANTES CONTROL ($n=12$)	IMPLANTES TRATADOS CON GH ($n=12$)
BIC: HUESO EN CONTACTO DIRECTO CON EL IMPLANTE (%)	25.05 \pm 2.43	40.19 \pm 2.51 ***
ÁREA PERIIMPLANTARIA TOTAL (%)	53.40 \pm 4.58	69.57 \pm 3.53 **
HUESO INTERROSCA (%)	25.08 \pm 3.47	27.92 \pm 3.31 N.S.
NEOFORMACIÓN ÓSEA (%)	28.65 \pm 1.92	35.18 \pm 0.31 ***

Se puede observar que existe un aumento significativo de hueso en contacto directo con el implante (BIC), del área periimplantaria total y de neoformación ósea; en los implantes tratados con GH en comparación con los implantes control. Se aprecia un mayor porcentaje de hueso interroscas en los implantes en los que se aplicó GH tópica en el lecho óseo, respecto a los implantes control, pero de un modo no estadísticamente significativo.

1.1. BIC (bone-to-implant contact ratio):

En la Figura 12, se representa el BIC en los implantes control y en los implantes con GH tópica. Se puede apreciar como dos semanas después de la intervención, la GH aumentó de forma significativa ($p < 0.0001$) el perímetro de hueso en contacto directo con los implantes, en relación a aquellos del grupo control que no recibieron tratamiento.

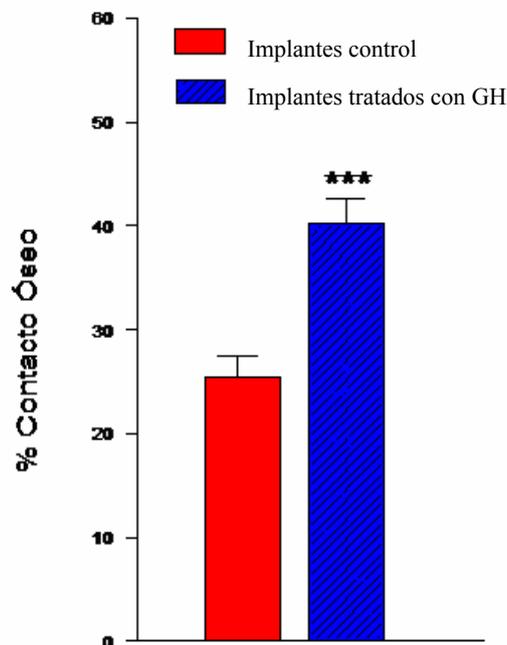


Figura 12. Porcentaje de contacto óseo (*bone-to-implant contact ratio: BCP*) en los implantes control y tratados con GH tópica dos semanas después de la intervención implantológica. *** $P < 0.0001$ vs. implantes control.

1.2. Hueso Periimplantario Total:

En la Figura 13, se expresa el porcentaje de hueso en la zona periimplantaria en los implantes control y tratados con GH tópica. La GH aumentó significativamente ($p < 0.0001$) la densidad ósea alrededor de los implantes dos semanas después de su colocación.

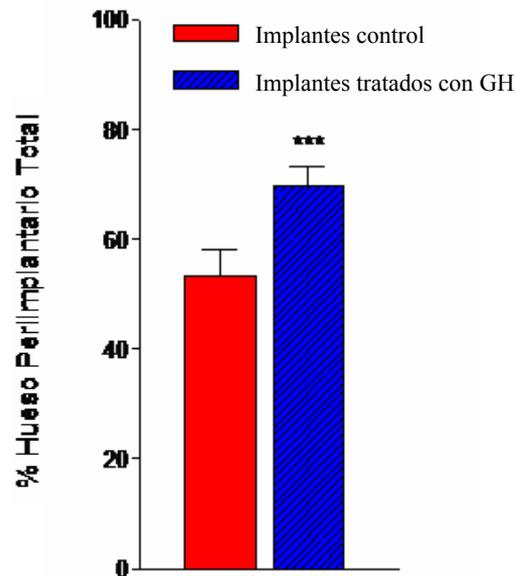


Fig. 13. Porcentaje de hueso total en la zona periimplantaria (*periimplant bone area*) en los implantes control y tratados con GH tópica dos semanas después de la intervención implantológica. ** $P < 0.001$ vs. implantes control.

En la Imagen 1, se ve una visión histométrica en la que se puede apreciar como a las dos semanas existe un bajo porcentaje de tejido óseo en contacto con el implante, y una gran cantidad de tejido vascular y conjuntivo, con poca formación de hueso, en la zona periimplantaria de los implantes que no fueron tratados con GH.

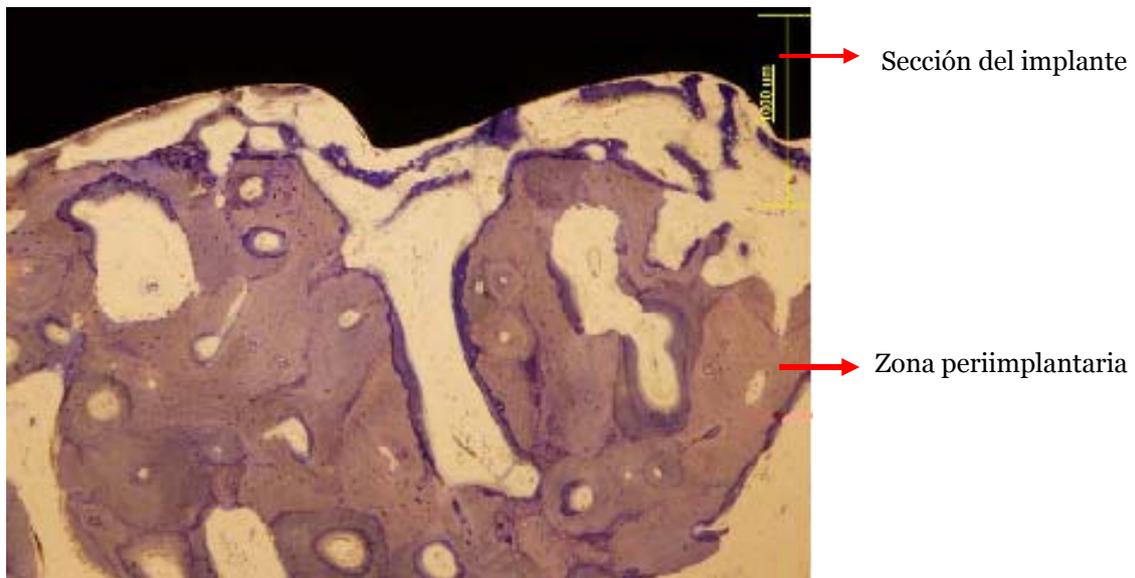


Imagen 1. Corte histológico de un implante control sin tratar con GH tópica. Sección correspondiente a la zona periimplantaria.

En la Imagen 2, visión histométrica de una sección sagital de un implante impregnado con GH tópica. Podemos apreciar, en relación al grupo control, un mayor porcentaje de tejido óseo en contacto con el implante, con una mayor formación de hueso y escasa aparición de tejido vascular y conjuntivo en la zona periimplantaria.

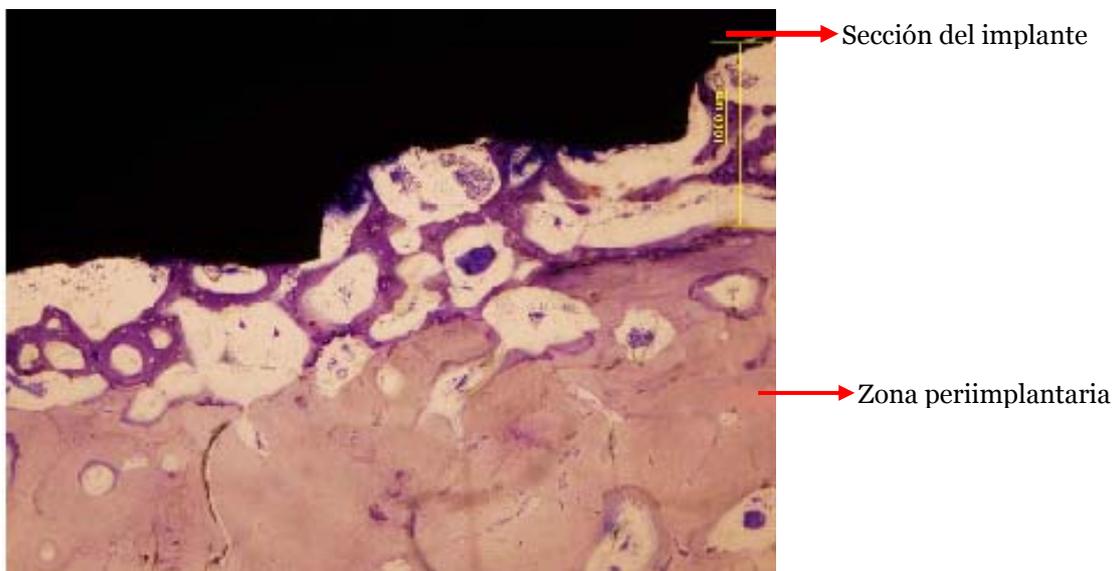


Imagen 2. Corte histológico de un implante control tratado con GH tópica. Sección correspondiente a la zona periimplantaria.

En la Imagen 3, se observa una sección sagital de un implante con GH, en relación al grupo control, con un mayor porcentaje de tejido óseo en contacto con el implante, con una mayor formación de hueso y escasa aparición de tejido vascular y conjuntivo en la zona periimplantaria.

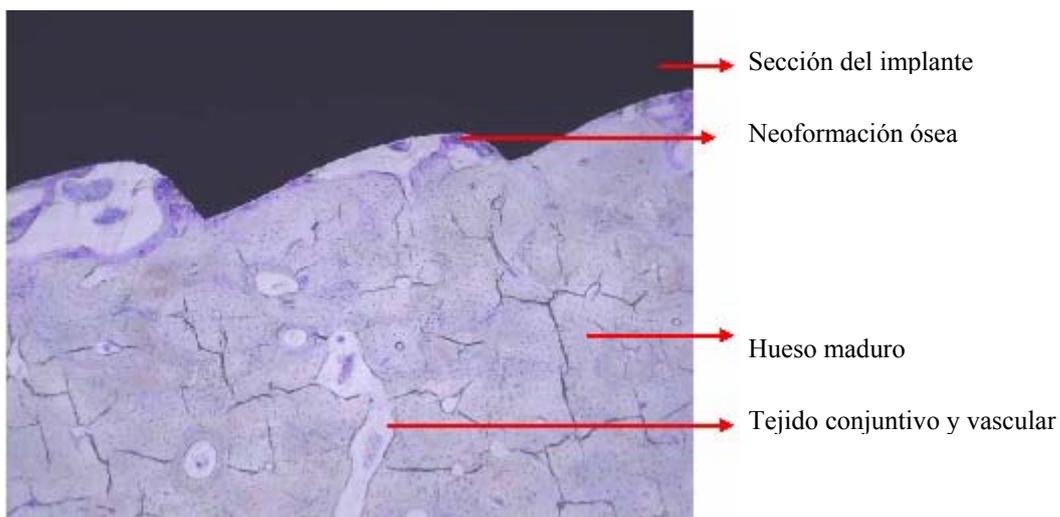


Imagen 3. Vista histométrica de un implante tratado con GH tópica. Se observa el mayor porcentaje de hueso en contacto con el implante en comparación con secciones similares en implantes control.

En la Imagen 4, se observa un corte sagital de un implante control no tratado con GH tópica. En esta sección existe mayor porcentaje de tejido conjuntivo y vascular, y menor porcentaje de hueso nuevo o maduro.

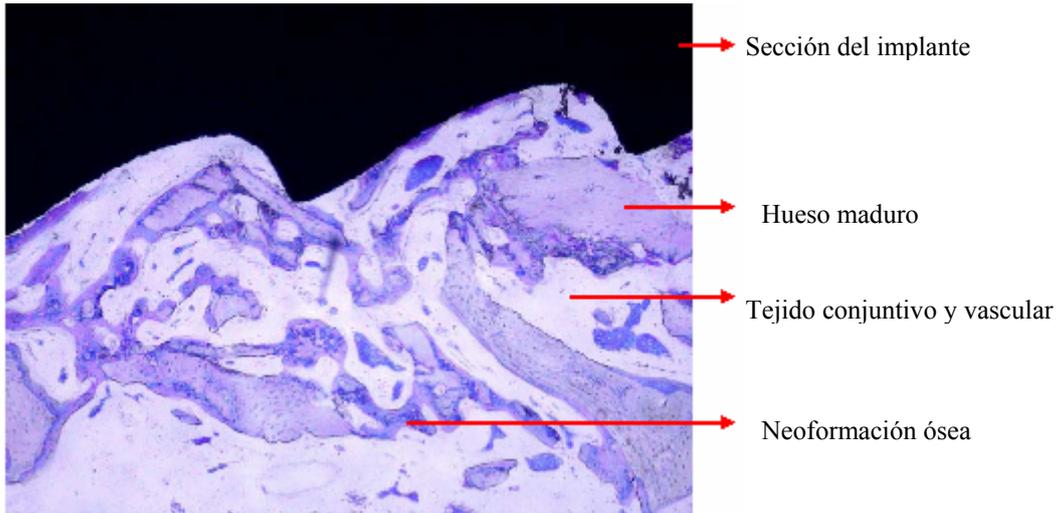


Imagen 4. Vista histométrica de un implante control. Las áreas blancas corresponden a tejido vascular y conjuntivo, las zonas azul oscuro a hueso nuevo, y las zonas azul claro a hueso maduro.

1.3. Hueso Interrosca (Inter-thread bone area):

En la Figura 14, se representa el porcentaje de hueso en el área interrosca, en los implantes control y tratados con GH. La GH no aumentó el porcentaje de hueso interrosca de una forma significativa respecto a los implantes control ($P > 0.05$).

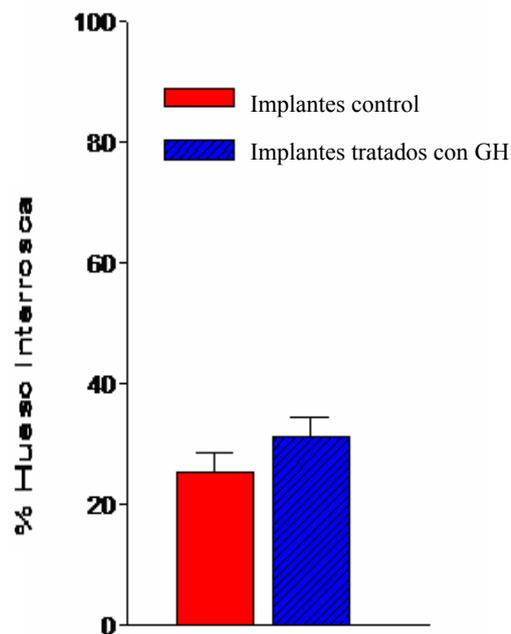


Fig. 14. Porcentaje de hueso en la zona interrosca (*inter-thread bone area*) en los implantes control y tratados con GH tópica dos semanas después de la intervención implantológica. *NS: $P > 0.05$* El resultado no fue estadísticamente significativo.

1.4. Neoformación ósea:

En la Figura 15, podemos observar el porcentaje de neoformación ósea en los implantes control y tratados con GH. La GH aumentó significativamente ($p < 0.0001$) la formación de hueso nuevo dos semanas después de la colocación de los implantes.

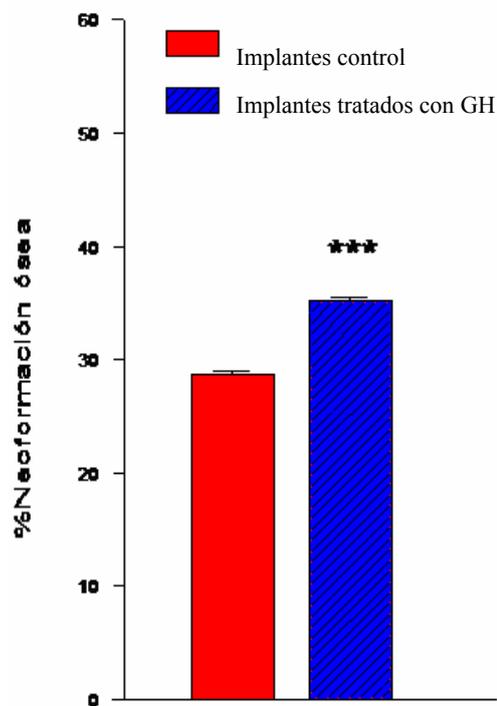
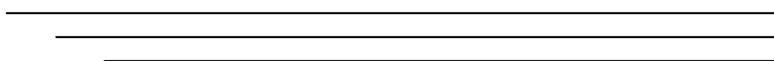


Fig. 15 Porcentaje de neoformación ósea en los implantes control y tratados con GH tópica, dos semanas después de la intervención implantológica. *** $P < 0.0001$ vs. Implantes control.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN:

Nos propusimos evaluar la acción de la GH sobre el proceso de osteointegración de implantes dentales, colocados en la mandíbula de perros Beagle, a las dos semanas de la intervención quirúrgica. Decidimos optar por el perro de raza Beagle por la capacidad que presenta para imitar la cresta alveolar del humano, siendo su manejo más sencillo y su costo menor que los otros tres biomodelos más evolucionados en la escala filogenética: oveja, minipig y primate. Además, este modelo experimental proporciona un volumen óseo adecuado para la colocación de los implantes, similar al del humano, lo cual sería inviable en otras especies más pequeñas (rata o conejo). Todos los perros de nuestro estudio fueron macho, porque las hembras podían producir alteraciones en los resultados debido a los estrógenos, ya que éstos influyen en el remodelado óseo como comentábamos en la introducción. Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro lado, disminuyen la reabsorción.

Al igual que en nuestro estudio, se ha observado en otros trabajos realizados en perros^(65, 66) que un período de curación de ocho semanas tras las exodoncias se hace indispensable para obtener una cresta alveolar edéntula, que presente un hueso organizado y unos tejidos blandos cicatrizados y estables para colocar los implantes.

Si consideramos ultraestructuralmente la interfase hueso-implante debemos referirnos al concepto de biointegración, que es la unión bioquímica directa entre el hueso vivo y la superficie del implante, demostrable a través de microscopía electrónica, independientemente de cualquier mecanismo mecánico de interunión. Así, el espacio existente entre el tejido óseo mineralizado y la capa de plasma de titanio del implante no es mayor de 10 Å y aparece lleno de un material matriz, los proteoglicanos⁽⁴⁹⁾. Una red de colágeno rodea los osteocitos y se inserta en la capa de glucoproteínas, que se fusiona con

la capa de óxido de titanio. Se cree que el óxido de titanio del implante induce la formación de glucosaminoglucanos sulfatados ⁽⁵⁰⁾. Las trabéculas óseas crecen acercándose al implante y contactando con la capa de plasma. Por ellas llegan los vasos que aportan nutrición, elementos celulares para la remodelación y rodean el implante; los fibroblastos y osteoblastos aumentan y al acercarse al implante se unen a la capa de óxido. Forman sustancia fundamental que llena los espacios trabeculares y se fusiona con la capa de óxido de titanio. Por tanto, y en contra de lo que se creía hasta hace unos años, la interfase implante-tejidos óseos es una zona dinámica sometida a una intensa actividad remodeladora por parte de las células óseas y la matriz extracelular ⁽⁵¹⁾.

En los últimos años se están utilizando diversos compuestos para mejorar la respuesta ósea periimplantaria como: factores de crecimiento ⁽⁶⁷⁾, proteínas morfogenéticas⁽⁶⁸⁾, y más recientemente hormonas, como la GH⁽⁴²⁾.

Las proteínas morfogenéticas (BMPs) son capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago. Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica ⁽¹⁹⁾. *Canalis et al.* ⁽⁴⁷⁾ creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.

La GH estimula la producción de colágeno y proteínas no colágenas por los osteoblastos; y, además, al estimular la síntesis de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF) por el hígado y los propios osteoblastos, favorece la diferenciación de los preosteoblastos y la proliferación de osteoblastos ⁽⁴²⁾. En los años 80, la hipótesis de la somatomedina, que decía que la GH estimula la producción del hígado de somatomedina, y ésta, a su vez, estimula el crecimiento longitudinal óseo de manera endocrina, fue cuestionada por un estudio [Isaksson et al. 1982] ⁽⁸⁷⁾, demostrando que inyectando GH directamente en la tibia de ratas, se producía crecimiento longitudinal óseo en el

sitio de la inyección. Esto demuestra que la GH regula y estimula el crecimiento óseo, actuando sobre las células óseas, tanto de manera directa, como indirecta (vía IGF-I), es decir, de forma autocrina y paracrina ⁽⁹⁰⁾.

La administración de GH se ha usado para incrementar la masa ósea y mejorar los procesos de reparación de fracturas de tibia en ratas ^(69,55). Así, se han investigado los efectos estimuladores locales de la GH sobre la formación de hueso en mandíbulas de rata ⁽⁷⁰⁾ y tibias de conejo osteoporóticas⁽⁴²⁾ o aumentando los efectos de GH local en la formación de hueso nuevo y reabsorción ósea usando una matriz de fosfato/calcio⁽⁵⁷⁾.

Los datos obtenidos en nuestro trabajo de investigación con la aplicación local de GH han mostrado diferencias histomorfométricas extremadamente significativas entre los implantes control y los implantes tratados con GH. A los 14 días de la colocación de los implantes, la GH tópica aumentó significativamente los parámetros de osteointegración: porcentaje de contacto óseo (BIC), hueso periimplantario total y porcentaje de neoformación ósea. De forma general, podemos decir que a los 14 días existe una mayor densidad ósea en los implantes con GH tópica en relación a los implantes control sin tratamiento.

La relación entre GH y metabolismo óseo ha sido puesta de manifiesto por numerosos estudios. Según algunos autores, la GH actuaría a nivel óseo como un factor de crecimiento local, con efectos paracrinos sobre las células contiguas ⁽⁷¹⁾.

En nuestro estudio, la mayor cantidad de tejido óseo en contacto directo con los implantes (BIC) que fueron tratados con GH tópica, sería reflejo de una mayor síntesis de matriz ósea en la zona periimplantaria, bien por un aumento en el número, bien en la actividad de células osteoblásticas a este nivel. En efecto, una importante acción de la GH a nivel óseo se centra sobre las células formadoras de hueso ⁽⁷²⁾. El hueso de la zona periimplantaria está sometido a un intenso proceso de remodelado tras la colocación del implante, por lo que gran parte de este hueso se encuentra en una fase más avanzada en su formación, en

forma de matriz ósea ya mineralizada, mientras que existirá también hueso periimplantario en fase de osteoide aún no mineralizado. Por tanto, el proceso de osteointegración incluye también, además de la remodelación del hueso ya existente, la formación de hueso nuevo alrededor del implante y en la zona interrosca.

En relación al mayor porcentaje de hueso periimplantario que se ha observado tras la aplicación local de GH, nuestros datos podrían interpretarse como un efecto directo de la GH sobre las células progenitoras mesenquimales, que estimularían líneas de osteoblastos y condroblastos. Este hecho vendría reforzado al haberse demostrado la presencia de receptores para la GH en los osteoblastos⁽⁷²⁾, fibroblastos^(68,73) y condroblastos^(74,75), así como los osteoclastos⁽⁷⁶⁾, condroclastos⁽⁷⁷⁾, macrófagos⁽⁷⁶⁾, cementoblastos y odontoblastos⁽⁵⁵⁾.

En nuestro estudio, por tanto, la GH tópica aumenta la reacción ósea periimplantaria. En este sentido, coincidimos con los datos obtenidos por Tresguerres *et al* ⁽⁴²⁾, en un trabajo realizado en tibia de conejos a los que se indujo osteoporosis, y con Mori *et al* ⁽⁷⁸⁾ en los que la osteointegración fue posible en animales osteoporóticos a los que se aplicó de forma local GH. El aumento en la proliferación de los osteoblastos llevado a cabo por la GH, se traduciría en un mayor número de estas células a nivel periimplantario, y la temprana diferenciación celular aceleraría notablemente la síntesis y mineralización de la matriz osteoide. Todo ello originaría una mayor cantidad de matriz ósea mineralizada alrededor de los implantes con GH; de ahí el aumento tan significativo a las dos semanas en el BIC y hueso periimplantario total. La administración local de GH durante el procedimiento quirúrgico puede producir un efecto estimulador sobre el número y función de condroblastos y osteoblastos en las primeras etapas del proceso de reparación ósea, que se podría denominar “efecto impulsor”.

La GH puede ejercer un efecto positivo sobre la mineralización incluso en las más bajas condiciones de calcio ^(79,80). La GH no sólo aumenta la absorción de calcio en el tubo digestivo ⁽⁸¹⁾, sino que también podría estimular la

biodisponibilidad del calcio local al incrementar la mineralización del nuevo tejido osteoide formado. Otra posibilidad sería estimular la osteólisis de los osteocitos y así aumentar la biodisponibilidad del calcio perilagunar en la laguna osteocítica.

Los resultados histomorfométricos obtenidos con la aplicación local de GH en el momento de la colocación de los implantes en perros Beagle son similares a los obtenidos por Tresguerres *et al*⁽⁸²⁾ en tibia de conejo en relación al hueso periimplantario, y por Lynch *et al*⁽⁶⁷⁾ quienes observaron que la administración local de factor de crecimiento derivado de plaquetas y IGF-I fue capaz de estimular la regeneración de hueso alrededor del titanio de los implantes dentales en las fases más tempranas de la cicatrización.

Nuestros datos concuerdan con los obtenidos por Cochran *et al*⁽⁸³⁾ que encontraron mayor porcentaje de hueso periimplantario en implantes que fueron tratados con proteína-2 morfogénica ósea humana recombinante. La GH contribuiría notablemente a la neoformación ósea alrededor de los implantes al estimular la diferenciación de nuevos preosteoblastos, que llegan desde la médula ósea al lecho alveolar a través de los vasos sanguíneos. En nuestro trabajo, el porcentaje de neoformación ósea que es mayor en el grupo tratado con GH se debió más al tejido óseo nuevo periimplantario que al hueso interrosca.

En relación al tejido óseo interrosca, aunque en el análisis estadístico no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos, las diferencias individuales fueron evidentes con más tejido óseo interrosca en el grupo experimental que recibió tratamiento con GH tópica. Otra acción de la GH a nivel preosteoblástico que contribuiría a aumentar la formación de nuevo tejido óseo, es la estimulación de ciertas proteínas de la matriz ósea. Así, se ha comprobado que la GH estimula la actividad génica del procolágeno tipo I (PICP), fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OC)⁽⁸⁴⁾ y la producción de IGF-I que tiene efecto estimulador sobre los osteoblastos y remodelado óseo⁽⁸⁵⁾. Todos estos hallazgos, por tanto, concuerdan plenamente con nuestros

resultados, que muestran un mayor porcentaje de neoformación ósea en los implantes tratados con GH tópica.

Nuestros resultados sugieren que la GH administrada en la zona de la colocación de implantes en una dosis de 4 UI (1.2 mg), podría ejercer un efecto impulsor en las primeras horas del proceso de osteointegración, reclutamiento de más preosteoblastos y así acelerar el proceso. El interés de estas acciones sobre el tejido óseo a nivel de la cavidad oral radica en la posibilidad de la aplicación de la GH en el acto de colocación de implantes dentales endoóseos, como agente biomimético, de modo que pueda mejorar la predictibilidad de los mismos y las condiciones tisulares iniciales del tejido receptor del implante. En cualquier caso, las posibilidades terapéuticas derivadas de las acciones de la GH a nivel óseo en la cavidad oral no sólo serían aplicables en el campo de la implantología, sino también en otros procesos como la enfermedad periodontal, que cursa con una progresiva pérdida ósea en sus fases más avanzadas. En definitiva, los resultados presentados en este trabajo de investigación pueden situar a la hormona de crecimiento como un potencial agente terapéutico a nivel odontológico, debido a la propiedad osteogénica dentro de la cavidad oral, acción que ya ha sido constatada en el resto del organismo ^(7, 53, 86-89).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

De los resultados obtenidos en nuestro estudio, se deducen las siguientes conclusiones:

1. La administración de GH tópica, aumenta significativamente la osteointegración de implantes dentales a las dos semanas de su colocación en los perros *Beagle*.
2. La aplicación tópica de GH actúa como agente biomimético en la colocación de implantes dentales endo-óseos, de forma que reduce los períodos de osteointegración y carga de los mismos.
3. La hormona de crecimiento se puede considerar como un potencial agente terapéutico a nivel odontológico, debido a la propiedad osteogénica dentro de la cavidad oral, acción que ya ha sido constatada en el resto del organismo, ejerciendo un efecto beneficioso, no sólo a nivel de la implantología, sino también de la enfermedad periodontal.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:

1. Devesa J, Esquifino A, Tresguerres J.A.F. Fisiología del sistema endocrino. En: Tresguerres JAF, editor. Fisiología humana. 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill; 1999. 889-905.
2. Barinaga M, Yamamoto G, Rivier C et al. Transcriptional regulation of GH gene expression by growth hormone-releasing factor. *Nature*, 1983; 306.
3. Genuth S. Sistema endocrino: El hipotálamo y la glándula hipofisaria. En: Berne R.M and Levy M.N, editores. Fisiología. 3ª edición. Madrid: Hacourt; 2001. 533-547.
4. Müller EE. Role of neurotransmitters and neuromodulators in the control of anterior pituitary hormone secretion. En: De Groot LJ, editor. *Endocrinology*. 3ª edición. Philadelphia: WB Saunders; 1995. 345-354.
5. Devesa J, Lima L, y Tresguerres J.A.F. Neuroendocrine control of GH secretion. *Trends, Endocrinology Metabolism*, 1992; 3: 175-183.
6. Tresguerres J.A.F. Somatomedinas. En: Moreno B and Tresguerres J.A.F, editores. Retrasos del crecimiento. Madrid: Díaz de Santos, 1996.
7. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 1998; 19(1):55-79.
8. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 1993; 55:131-53.

9. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. *Endocrinology* 1995; 136:124-31.
10. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991; 263:30-48.
11. Langdahl B.L, Kassem M, Moller M.K. and Eriksen E.F. The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:176-183.
12. Hunziker E.B, Wagner J, Zapf J. differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes *in vivo*. *J Clin Invest* 1994; 93: 1078-1086.
13. Ohlsson C, Vidal O. Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on human osteoblasts. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(3):184-6.
14. Anitua E. Introducción a la biología ósea. En: Anitua E, editor. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento. Vitoria: Puesta al día publicaciones, S.L. ; 2000. 17-31.
15. Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres J.A.F, editor. Fisiología humana. 3ª edición. Madrid: McGraw-Hill; 2005. 981-994.
16. Arnett, TR. Estructura y remodelado del hueso. En: J. A. Riancho Moral and J. Gonzales Macías, editors. Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Madrid: Jarpyo Editores; 2004. 1-6.
17. Gheron Robey P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2º edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 225-238.

18. Anderson, H.C. Mechanism of mineral formation in bone. *Lab invest* 1989; 60: 320-330.
19. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000; 21(4):393-411.
20. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89:765-71.
21. McCarthy TL, Ji C, Centrella M. Links among growth factors, hormones, and nuclear factors with essential roles in bone formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(4):409-22.
22. Grzesik, W. J. y Robey, P.G. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 487-496.
23. Lean JM, Mackay AG, Chow JW, Chambers TJ. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *Am J Physiol* 1996; 270(6):937-45.
24. Nijweide, P.J. y cols. Cells of bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiol Rev* 1986; 66: 855-886.
25. Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: Tresguerres JAF, editor. *Fisiología Humana*. 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1999. p. 979-993.
26. Rodman, G. D. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17: 308-332.

27. Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2^o edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 109-126.
28. Väänänen K, Zhao H. Osteoclast function: biology and mechanisms. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2^o edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 127-140.
29. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289(5484):1504-8.
30. Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-5055.
31. Lawrence G, Raisz MD, Gideon A, Roldan. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003; 32: 15-24.
32. Riggs BL, Sundeep K, Melton III J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23: 279-302.
33. Genuth S. Sistema endocrino: Regulación endocrina del metabolismo del calcio y del fosfato. En: Berne R.M and Levy M.N, editores. *Fisiología*. 3^a edición. Madrid: Hacourt; 2001. 519-530.
34. Salo J. y cols. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 1997; 276: 270-273.
35. Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores Reguladores de la Resorción Ósea. *Rev Metab Oseo Min* 2003; 1(2):51-66.
36. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera García MA, Del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea

- II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:151-7.
37. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodelling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18:903-18.
38. Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res* 1993; 8:457-65.
39. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140:4367-70.
40. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21:115-37.
41. Lukert BP, Kream BE. Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press; 1996.p.533-48.
42. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gómez-Pellico L, Blanco L, Alobera MA et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(6):631-6.
43. Horowitz MC and Lorenzo JA. Local regulators of bone: IL-1, TNF, lymphotoxin, Interferon-g, IL-8, IL-10, IL-4, the LIF/IL-6 family, and additional cytokines. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2^o edition. Volume 2. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 961-978.

44. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A. Interleukin-6: A potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 1992; 89:46-52.
45. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995; 313:36-46.
46. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993; 64:432-44.
47. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24:218-35.
48. Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Prótesis Tejido-Integrada. La oseointegración en la Odontología Clínica*. Barcelona: Quintessence; 1999. p.11-13.
49. Schoeder A, Van der Zipen E, Stich H, Sutter F. The reaction of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with sprayed titanium surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981; 9:15-25.
50. Peñarrocha Diago M, Oltra Moscardó MJ, Sanchís Bielsa JM. Conceptos generales de implantología. En: Peñarrocha Diago M, editor. *Implantología oral*. Barcelona: Ars Médica; 2005. p. 3-17.
51. Steflik DE, Parr GR, Sisk AL, Lake FT, Hanes PJ, Berkery DJ. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. *J Periodontol* 1994; 65:404-13.
52. Harris WH, Heaney RP. Effect of growth hormone on skeletal mass in adult dogs. *Nature* 1969; 223(204):403-4.

53. Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 1990; 323(1):1-6.
54. Brixen K, Kassem M, Nielsen HK, Loft AG, Flyvbjerg A, Mosekilde L. Short-term treatment with growth hormone stimulates osteoblastic and osteoclastic activity in osteopenic postmenopausal women: a dose response study. *J Bone Miner Res* 1995; 10(12):1865-74.
55. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone* 1990; 11:233-9.
56. Andreassen TT, Jorgensen PH, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1057-67.
57. Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, Daculsi G, Heymann D. Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial stimulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4):739-48.
58. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington DC: National Academy Press; 1996.
59. Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre proteccion de los animales utilizados para la experimentacion y otros fines cientificos. (Nº 7026, B.O.E. nº 67, 18 de marzo de 1988, pag. 8509-8511).

60. Herrero Climent M, Herrero Climent F. Atlas de procedimientos clínicos en implantología oral. Madrid: TRP Ediciones; 1995.
61. Donath K. Preparation of histologic sections by the cutting-grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods. Equipment and methodical performance. Norderstedt: Exakt-Kulzer-Publication; 1995.
62. Baron R, Vignery A, Neff L, Silverglate A, Santa María A. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Becker RR, editor. Bone histomorphometry: techniques and interpretation. Boca Raton, FL: CRC Press; 1993. p.13-37.
63. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F (eds.). Bone histomorphometry. New York: Raven Press; 1994.
64. Nkenke E, Lehner B, Weinzierl K, Thams U, Neugebauer J, Steveling H et al. Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs. Clin Oral Impl Res 2003; 14(3):312-21.
65. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. Biochem J 1984; 222:1-15.
66. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 1996; 16:33-50.
67. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. J Periodontol 1991; 62(11):710-6.

68. Cook JJ, Haynes KM, Werther GA. Mitogenic effects of growth hormone in cultured human fibroblasts. Evidence for action via local insulin-like growth factor I production. *J Clin Invest* 1988; 81(1):206-12.
69. Bak B, Andreassen TT. The effect of growth hormone on fracture healing in old rats. *Bone* 1991; 12:151-4.
70. Hedner E, Linde A, Nilsson A. Systemically and locally administered growth hormone stimulates bone healing in combination with osteopromotive membranas: An experimental study in rats. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1952-60.
71. Harvey S, Kull KL. Growth hormone, a paracrine growth factor?. *Endocrine* 1998; 7:267-79.
72. Stracke H, Schulz A, Moeller D, Rossol S, Schatz H. Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C/IGF I in bone organ culture. *Acta Endocrinol* 1984; 107(1):16-24.
73. Sloomweg MC, van Buul-Offers SC, Herrmann-Erlee MP, van der Meer JM, Duursma SA. Growth hormone is mitogenic for fetal mouse osteoblasts but not for undifferentiated bone cells. *J Endocrinol* 1988;116(3):11-3.
74. Maor G, Hochberg Z, von der Mark K, Heinegard D, Silbermann M. Human growth hormone enhances chondrogenesis and osteogenesis in a tissue culture system of chondroprogenitor cells. *Endocrinology* 1989; 125(3):1239-45.
75. Lewinson D, Shenzer P, Hochberg Z. Growth hormone involvement in the regulation of tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells that are active in cartilage and bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1993; 52(3):216-21.

76. Chihara K, Sugimoto T. The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Hormone Res* 1997; 48:45-9.
77. Zhang CZ, Young WG, Li H, Rolinson S, Waters MJ. Growth hormone regulates nucleolar organizer regions during odontogenesis in the rat. *J Oral Pathol Med* 1992; 21(9):395-400.
78. Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(4):351-61.
79. Eschen C, Andreassen TT. Growth hormone normalizes vertebral strength in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1995; 57(5):392-6.
80. Kidder LS, Schmidt IU, Evans GL, Turner RT. Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 61(4):327-35.
81. Chipman JJ, Zerwekh J, Nicar M, Marks J, Pak CY. Effect of growth hormone administration: reciprocal changes in serum 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D and intestinal calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51(2):321-4.
82. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JA. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(2):193-202.
83. Cochran DL, Schenk R, Buser D, Wozney JM, Jones AA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol* 1999; 70(2):139-50.

84. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksen EF. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1993; 52(3):222-6.
85. Chenu C, Valentin-Opran A, Chavassieux P, Saez S, Meunier PJ, Delmas PD. Insulin-like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25 (OH)₂D₃ and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone* 1990; 11:81-6.
86. Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN. Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone* 1998; 23(4):343-52.
87. Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 1982; 216(4551):1237-9.
88. Marcus R. Skeletal effects of growth hormone and IGF-I in adults. *Horm Res* 1997; 48:60-4.
89. Brixen K, Kassem M, Eriksen EF, Nielsen HK, Flyvbjerg A, Mosekilde L. Growth hormone (GH) and adult bone remodeling: the potential use of GH in treatment of osteoporosis. *J Pediatr Endocrinol* 1993; 6(1):65-71.
90. Blom EJ, Verheij JGC, de Blicck-Hogervorst JMA, Di Silvio L, Klein CPAT. Cortical bone ingrowth hormone-loaded grooved implants with calcium phosphate coatings in goat femurs. *Biomaterials* 1998; 19: 263-70.