

## REPARACIÓN DE DEFECTOS SEGMENTALES ÓSEOS CON VIDRIO BIOACTIVO Y UNA MEMBRANA NO ABSORBIBLE

Audisio, S. A.<sup>1</sup>; Audisio, S. N.<sup>1</sup>; Vaquero, P.<sup>1</sup>; Verna, E.<sup>1</sup>; Tolouse, J. C.<sup>2</sup>; Bozac, D.<sup>1</sup>; Costi, M. R.<sup>1</sup>

1. Cátedra Técnica y Patología Quirúrgica Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam.. [saudisio@lapampa.com.ar](mailto:saudisio@lapampa.com.ar). 2. Hospital Lucio Molas, Santa Rosa, La Pampa.

### RESUMEN

Se informa la reparación de defectos segmentales óseos de tamaño crítico mediante la combinación de vidrio bioactivo y una membrana no absorbible de politetrafluoroetileno expandido (PTFe). Se emplearon 24 conejos neocelandeses machos y hembras sexualmente maduros a los que se les creó un defecto segmental crítico en las diáfisis de los radios. El defecto se rellenó con partículas de vidrio bioactivo. Los cabos del radio y los gránulos se envolvieron con una membrana de PTFe. Inmediatamente de finalizadas las intervenciones, cada 30 días y durante 150 días se efectuaron controles radiológicos de los miembros intervenidos. Transcurridos los 150 días de tratamiento en la totalidad de los ensayos se observó que los defectos se hallaban reparados. Las radiografías de control tomadas luego de finalizadas las operaciones mostraban a las partículas de vidrio ocupando el defecto a modo de un fino granulado; a los 30 días los gránulos no se distinguían entre sí y conformaban una masa uniforme y radiodensa que con el transcurso de los controles adquirió mayor radiodensidad; a los 150 días la imagen era la reparación de los defectos. A los 150 días los animales fueron sacrificados para efectuar análisis macro y microscópico del hueso neoformado. Los estudios histológicos efectuados en cortes sagitales que incluyeron los extremos del radio y el hueso neoformado que el hueso regenerado estaba constituido por numerosas trabéculas que contenían médula roja y presencia aislada de gránulos de vidrio. La membrana de PTFe protegió los gránulos de vidrio bioactivo mezclado con el coágulo de sangre proveniente de los cabos óseos seccionados. Las reacciones químicas de los gránulos con los líquidos tisulares se pusieron en evidencia a los 30 días cuando éstos se fusionaron, momento a partir del cual comenzó los procesos de osteoconducción y osteoinducción. Los mecanismos de proliferación y diferenciación mesenquimática que promueven y desencadenan la combinación del PTFe y los gránulos de vidrio bioactivo permitieron la reparación del defecto con la generación de hueso nuevo conteniendo médula roja. La combinación de los biomateriales promueven la inducción de tejido óseo en huesos largos.

**Palabras claves:** hueso, PTFe, vidrio bioactivo, osteoinducción, osteoconducción, conejo.

### Repair of segmental bone defects of critical size with the use of a combination of bioactive glass and a non-absorbable membrane

### SUMMARY

The authors inform the repair of segmental bone defects of critical size with the use of a combination of bioactive glass and a non-absorbable membrane of expanded polytetrafluoroethilen (ePTF). Twenty four New Zealand rabbits - sexually mature males and females - were used. They were kept in individual cages with controlled temperature and fed ad libitum with a commercial formula. A critical segmental defect in the diaphysis of the radius was created in each rabbit. The defect was filled with bioactive glass granules with a particle size of 300 to 600  $\mu\text{m}$ . The extremes of the radius and the granules of bioactive glass were

wrapped up with a ePTF membrane. Immediately after the surgical procedure, and every 30 days during a period of 150 days, X-ray controls of the operated limbs were carried out. The rabbits recovered total bearing between 48 – 72 hs. after the operation. After 150 days of treatment, the defects were repaired in all the rabbits. The control X-rays taken after the operation showed that the particles of glass occupied the defect had a thin granular shape. Thirty days later, the granules were not differentiated and made up a uniform and radio-dense mass that became more radio-dense in the following radiographic controls. After 150 days the x-ray images showed that the defects were fully repaired. At that moment, the animals were killed to make a macro- and microscopic analysis of the newly-formed bone. The sagittal cuts of the histological tissue that included the ends of the radius and the newly-formed bone showed that the segmental bone was constituted by numerous trabeculas that contained bone marrow and isolated presence of glass granules. The ePTF membrane protected the bioactive glass granules mixed with the blood clot coming from the cut bone tips. The ionic exchanges between the ions of Ca and P of the glass granules and the same ions of the tissue were evident 30 days after the operation when they fused. Since then, the processes of osteoconduction and osteoinduction started. The scarce presence of granules contained in the newly-formed bone suggest that the granules were absorbed. The bone regeneration was possible due to the protective action of the blood clot of the ePTF membrane and to the osteoinductive action of the bioactive glass granules that unfettered the mechanism of proliferation of the mesenchymal cells and their differentiation into osteoblasts and marrow tissue. The combination of both bio-materials fosters the induction of bone tissue in long bones.

**Key words:** bone, ePTF, bioactive glass, osteoinduction, osteoconduction, rabbit.

## INTRODUCCION

El desarrollo de diversos bio-materiales con capacidad osteogénica, se debió a la necesidad evitar los trastornos y complicaciones que surgen de la ejecución de los injertos y autoinjertos, entre los que se mencionan la transmisión de los virus HIV y Hepatitis B, rechazos, y escasa cantidad de tejido que se pueden obtener para realizar los autoinjertos (Blanchard, 1995; Markowitz, 1967).

El objetivo de la investigación consistió en determinar la reparación de defectos segmentales de tamaño crítico mediante la combinación de dos bio-materiales cuya acción osteogénica está comprobada en los huesos planos.

### *Implantes de politetrafluoroetileno*

El politetrafluoroetileno expandido (PTFe) demostró capacidad regeneradora de hueso en forma guiada 5 en defectos de huesos planos en variados modelos experimentales que incluyeron primates, perros y animales de laboratorio (Bartee,

1990); Becker, 1991; Bouchard et al., 1993; Caffesse et al., 1993; Hürzeler et al., 1996; Lang et al., 1995; Sander et al., 1994; Sigurdsson et al., 1996; Stone et al., 1996; Zellin et al., 1992). El PTFe genera un espacio protegido sobre el defecto que alberga al coágulo sanguíneo permitiéndole al tejido dañado repoblarse de células propias. Hämmerle (1995) comunicó que en defectos de huesos planos transcurridos 7 días, comienzan a observarse finas trabéculas entrelazadas de hueso que crecen en el altamente vascularizado tejido conectivo laxo que ocupa el defecto y que dos semanas más tarde se detectan islas de hueso nuevo. Subsecuentemente aparecen pequeñas islas nuevas que coalescen y forman islas mayores. En estadios avanzados las trabéculas se refuerzan con capas de hueso laminar depositadas regularmente.

La reparación de defectos rígidos provocados en huesos planos requiere 120 días. La osteogénesis se incrementa entre los 7 a 60 primeros días, durante los 60 días posteriores el incremento adicional es limitado (Bluhm et al. 1993). Linde y col (1993) observaron que defectos óseos de huesos temporales de ratas se rellenaban al

cabo de 16 semanas en un 80% con hueso neoformado dependiendo del espesor y porosidad de la membrana de PTFe. La cantidad de hueso hallado fue directamente proporcional al tiempo post-quirúrgico transcurrido, en tanto en los defectos que no se trataron con teflón sólo proliferó tejido conectivo.

### **Vidrio bioactivo**

Los gránulos de vidrio bioactivo se emplean como material de relleno de defectos óseos rígidos, pues poseen la habilidad de unirse con el tejido óseo que lo circunda (Hench et al., 1973) y de estimular el crecimiento de hueso debido a propiedades osteoconductoras (Ducheyne et al., 1979; Furusawa et al., 1997; Gatti et al., 1993; Hench et al., 1973; Schepers et al., 1986; Schepers et al., 1989) y osteoinductoras (Schepers et al., 1991; Schepers et al., 1988).

Los gránulos de vidrio bioactivo se obtienen de mezclar  $\text{SiO}_2$  (45%);  $\text{CaO}$  (24,5%);  $\text{Na}_2\text{O}$  (6%) y  $\text{P}_2\text{O}_5$  (6%) que se funde en un crisol a  $1350^\circ\text{C}$  durante 24 hs. Cuando se solidifica se tritura mecánicamente y tamiza para obtener partículas de distintas dimensiones que luego se limpian mediante ultrasonido y esterilizan con radiación gamma (Sander et al., 1984).

Las partículas de vidrio bioactivo se encuentran constituidas por cuatro óxidos: de sodio, silicio, calcio y fósforo. La estructura intencionalmente es inestable para que reaccione con los fluidos y células que lo rodean. El sodio por un fenómeno de exiliación cumple función dual interviniendo en la formación de una capa superficial de fosfato cálcico con características similares a la fase mineral del hueso y en la formación del gel de silicio que es resorbido. El calcio y sodio son empleados, en parte, por la reacción exterior en tanto el gel interno es resorbido por un proceso combinado de dilución y de resorción por acción de los macrófagos (Furusawa et al. 1997).

El fenómeno osteogénico guiado por las partículas de vidrio bioactivo comienza con un intercambio iónico entre la superficie de la partícula y los líquidos

tisulares que la rodean. El intercambio resulta la formación de un gel de silicio que rápidamente es cubierto por una capa rica en calcio y fósforo (semejante a la matriz mineral) (Schepers et al., 1993).

Consecuente con la reacción química la capa mineral presenta fisuras que le permite a los macrófagos penetrar en el gel y resorberlo. La resorción crea cavidades en las que se asientan células mesenquimáticas osteoprogenitoras que adquieren características fenotípicas de osteoblastos por estímulo de contacto con la superficie mineral. La diferenciación genera islas de hueso nuevo que se forman sin la necesidad de proliferación osteoblástica de hueso pre-existente y se comportan como centros de reparación de hueso (Schepers et al., 1993). Inmediatamente de iniciados los procesos de osteoinducción comienzan los procesos de osteoconducción sobre la superficie de los gránulos de vidrio bioactivo que se hallan en estrecho contacto con la superficie de tejido óseo (Furusawa et al., 1997).

Las dimensiones de las partículas de vidrio bioactivo se encuentran en estrecha relación con su capacidad osteogénica (Schepers et al., 1989). Schepers y Ducheyne (1997) compararon los resultados de rellenar defectos óseos con partículas de tamaño variable: 212-300  $\mu\text{m}$ , 300-355  $\mu\text{m}$ , 425-800  $\mu\text{m}$ , y 100-710  $\mu\text{m}$  en defectos rígidos en mandíbulas de perros Beagles. Reportaron que los resultados óptimos de curación se obtuvieron en los animales tratados con partículas que midieron entre 300 y 350  $\mu\text{m}$  (Schepers et al., 1997; Schepers et al., 1988). Las partículas de tamaño inferior sufren resorción total del gel y no actúan de soporte para las células mesenquimáticas, en tanto las partículas que exceden las 360  $\mu\text{m}$  sus superficies no son horadadas y por consiguiente no sufren resorción del gel impidiendo la migración mesenquimática (Schepers et al., 1988).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Modelo experimental**

Se emplearon 24 conejos neoce-

landeses machos y hembras sexualmente maduros que fueron mantenidos en condiciones de temperatura controlada y alimentados con una fórmula balanceada comercial. A cada uno de los animales se les practicó en las diáfisis de uno de los radios un defecto segmental de tamaño crítico igual a 1.5 veces el diámetro del hueso (Bruder et al., 1998). El defecto fue rellenado con gránulos de vidrio bioactivo<sup>#</sup> constituido de SiO<sub>2</sub> (45%); CaO (24,5%); Na<sub>2</sub>O (6%) y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (6%) P/P cuyo tamaño de partícula fue 300 - 600 µm. El defecto fue rellenado con las partículas de vidrio y al igual que los cabos del radio fueron cubiertos con un implante de PTFe<sup>@</sup> de 25 x 30 mm. Se realizó seguimiento radiológico de los defectos durante 150 días, al cabo de los cuales los animales fueron sacrificados con sobredosis de tiopental intracardiaco para realizar examen macro y microscópico de los defectos reparados.

### **Procedimiento quirúrgico**

#### **Pre-operatorio**

Antes de realizar las intervenciones se tomaron radiografías de los antebrazos que serían intervenidos a los efectos de determinar la madurez sexual y a la vez las dimensiones del espacio crítico. Luego de un ayuno de 24 horas los conejos fueron sedados con 0,1 mg/kg. IM de acepromacina\* y a los 10 minutos anestesiados con 40 mg/k IM de ketamina °.

#### **Intraoperatorio**

Con los conejos ubicados en decúbito lateral y en condiciones de asepsia, se efectuó una incisión de la piel y tejido subcutáneo en la cara dorsal del antebrazo que permitió el acceso e incisión de la fascia anterior del antebrazo y se procedió a disecar los músculos dorsales del antebrazo para acceder a la diáfisis radial y

proceder a crear el defecto crítico según las medidas tomadas de las radiografías. La extracción del hueso se realizó mediante dos osteotomías por acción de una sierra manual previa sección del ligamento interóseo.

Luego de lavar el defecto con solución fisiológica para eliminar las partículas de hueso se procedió a colocar los implantes de PTFe. Antes de colocar las membranas la incisión del ligamento interóseo se extendió hacia las extremidades proximal y distal del hueso para permitir el desplazamiento del implante entre el radio y la ulna. Cuando la membrana se halló ubicada se colocaron las partículas de vidrio bioactivo rellenando el espacio que era limitado por la membrana. Con los extremos de la membrana se procedió a envolver los cabos seccionados del radio y con éste las partículas de vidrio. No se colocaron puntos de fijación, pues la sutura de los músculos de la región mantuvo los implantes en el sitio. Los músculos, fascias y piel se suturaron según técnicas de rutina (Fig. N° 1).

#### **Post-operatorio**

Inmediatamente de finalizadas las intervenciones quirúrgicas los animales retornaron a sus jaulas individuales y diariamente durante la primer semana recibieron 30 mg/kg. IM de oxitetraciclina<sup>+</sup> y 1 mg/Kg. IM de ketoprofeno<sup>§</sup>.

#### **Seguimiento clínico**

Durante la primer semana se evaluó el apoyo y uso que daban los animales a los miembros operados como así también los aspectos macroscópicos de la región topográfica intervenida

#### **Seguimiento radiológico**

Inmediatamente de finalizadas las intervenciones se tomaron radiografías de

<sup>#</sup> B&W, Bs. As., Argentina

<sup>@</sup> B&W, Bs. As., Argentina

control de los antebrazo intervenidos y luego con una frecuencia mensual durante 5 meses. Las proyecciones radiológicas fueron dorso-palmares y latero-laterales.

### **Histología**

Se obtuvieron muestras del tercio medio del antebrazo conteniendo al cúbito, radio y el defecto tratado. Luego de desmineralizar el hueso se obtuvieron cortes transversales y tangenciales para observar el hueso preexistente y el hueso neoformado. Los cortes se montaron y tñieron con hematoxilina-eosina y observados con microscopio óptico.

### **RESULTADOS**

De acuerdo a la metodología implementada la observación de hueso neoformado se efectuó en forma progresiva conforme se realizaron los controles radiográficos en cada animal. La totalidad de conejos intervenidos mostraron la presencia de hueso en el sitio que se realizó el defecto segmental crítico al término de 150 días post-operatorio.

### **Modelo experimental**

Todos los animales tomaron alimentos y agua a las 24 horas de las operaciones. Presentaron claudicación de cuarto grado del miembro intervenido sólo durante los 2-3 primeros días post-operatorios. Los miembros mostraron inflamación durante 3-4 días inmediatos a las operaciones, en tanto las heridas de los miembros no mostraron complicaciones, los puntos se retiraron a los 8 días (fig. N° 2)

### **Seguimiento radiológico**

Las radiografías tomadas luego de finalizadas las intervenciones mostraron que los gránulos de vidrios bioactivo se encontraban ocupando los defectos óseos,

siendo éstos radio opacos y de aspecto de un fino granulado. A los 30 días los gránulos no se distinguían entre sí y conformaban una masa uniforme y radiodensa que con el transcurso de los controles adquirió mayor radiodensidad durante los primeros 90 días, momento a partir del cual pudimos observar continuidad entre los cabos óseos del radio y la masa que conformaron los gránulos. Hacia el día 150, la imagen radiológica de los defectos fue la reparación de los defectos (Fig. N° 3)

### **Aspecto macroscópico**

Efectuadas las necropsias de los miembros se observó que el tejido que rodeaba los implantes era tejido fibroso consecuente con las reparaciones de los tejidos blandos. En ninguno de los animales se observó reacción de rechazo a los implantes. En los sitios de contacto de los implantes con el periostio se observó la proliferación de hueso que tendía a incluir el implante sobrepasando 1-2 mm sus bordes. Cuando los implantes fueron retirados se observó que la superficie del hueso neoformado poseía aspecto similar a la superficie de los implantes.

Cuando los implantes fueron retirados se observó que el hueso neoformado descubierto poseía aspecto granular.

### **Análisis histológico**

A los 150 días se observó continuidad de la estructura tisular entre el hueso neoformado y el hueso huésped. El hueso nuevo presentaba trabéculas, osteoblastos (Fig. N° 5) y la presencia de tejido de granulación rellenando las trabéculas (Fig N° 6). En el tejido de granulación se observó la presencia de numerosos macrófagos conteniendo grandes vacuolas de color amarillo (Fig. N° 7). No se observó la presencia de gránulos

\*Acedan, Holliday, Bs. As., Arg. ° Ketamina 50, Holliday, Bs. As., Arg. † Terramicina, Pfizer, Bs.As., Arg. § Ketofeno, Estrella, Bs.As., Arg

de vidrio bioactivo como así tampoco de linfocitos/monocitos en el hueso neoformado o en el hueso huésped y tejido blando circundante. No se observó osificación endocondral.

## DISCUSION

El modelo experimental mostró ser apropiado para efectuar este tipo de investigaciones, pues el cúbito mantiene estabilizado al miembro y con ello se evitan técnicas de coaptación interna o externa que presupongan interferencias en el sitio motivo de estudio.

Los cambios radiológicos observados a los 30 días sugieren que las partículas de vidrio bioactivo coalescieron debido a los intercambios de líquidos y de iones de Ca y P entre los cristales y el medio tisular. La unión de los gránulos generó una matriz de fosfato tricálcico semejante a la matriz inorgánica del hueso. La continuidad observada entre los cabos del radio y el conjunto de gránulos hace suponer que éstos son los resultados de los procesos de osteoconducción (Furusawa et al., 1997) y la consiguiente integración de la nueva matriz inorgánica generada por los gránulos con el hueso.

La presencia de tejido de granulación sugiere que la irrigación del biomaterial y de las células mesenquimáticas se hizo por esta vía tal como sucede en los mecanismos de reparación de las fracturas (Slatter, 1993) sólo que no se diferenció en fibrocartilago y por consiguiente no hubo mineralización de cartilago y osificación endocondral.

Los implantes de vidrio bioactivo indujeron primero la formación de una matriz cuya estructura y composición química se semeja a la matriz mineral del hueso que a su vez induce la diferenciación mesenquimática en osteoblastos a partir de los cuales prolifera en hueso nuevo. Este mecanismo posiblemente impide la generación de cartilago y la consecuente osificación endocondral.

Luego de 150 días no se observó la presencia de los gránulos, pero en cambio fue factible hallar macrófagos conteniendo

grandes vacuolas ligeramente amarillas que nos hicieron suponer que el contenido era el gel de silicio provenientes de los gránulos. Si los vacuolas contienen silicio y éstas fueron observadas a los 150 días, el organismo absorbe el mineral pero lo contiene al menos durante 5 meses. La presencia de los macrófagos conteniendo silicio en las zonas del tejido de granulación señalan esta vía como forma de eliminación.

El tamaño de las partículas utilizadas en los ensayos ofrecieron resultados satisfactorios ya que en el 100% de los animales se registró curación de los defectos. Schepers y Ducheyne (1997) hallaron que los resultados óptimos en defectos rígidos de huesos planos con partículas de vidrio bioactivo de 300-350  $\mu\text{m}$ . Los mismos autores informan que partículas de tamaño inferior a 300-350  $\mu\text{m}$  son resorbidas totalmente antes que se produzcan mecanismos de inducción/conducción ósea y que partículas mayores fueron encapsuladas en modelos experimentales idénticos.

La ausencia de linfocitos/monocitos y fibroblastos sugieren que la composición química y las dimensiones de los gránulos no interfirieron con el proceso osteoconductor/inductor, por el contrario consideramos que dicha ausencia indica la integración del biomaterial con el hueso y el organismo receptor.

El PTFE fue presentado como un biomaterial regenerador de hueso (Bosch et al., 1995; Caffesse et al., 1993; Hürzeler et al., 1991; Linde et al., 1990; Pinto et al., 1996; Sander et al., 1994; Sigurdsson et al., 1996; Simion et al., 1993; White et al., 1994) y en realidad le caben funciones secundarias, pues no brinda soporte. Se requerirán nuevas líneas de investigación para obtener mayor conocimiento de biomateriales osteoconductores y de los elementos inductores (proteínas morfogenéticas del hueso (PMH)).

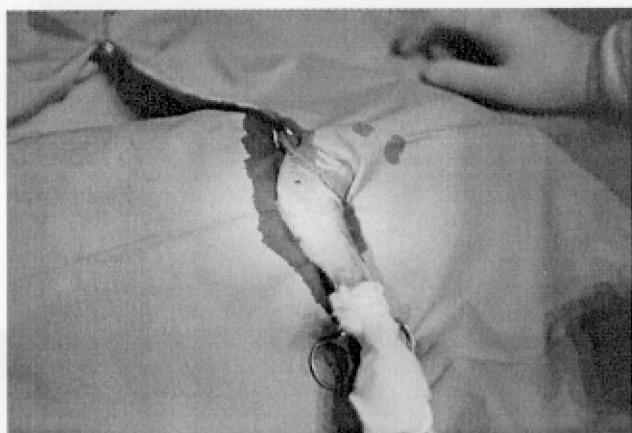
Se requerirá en un futuro inmediato estudios a largo plazo para determinar los procesos de remodelación ósea, porcentaje de hueso que puede ser sustituido por los gránulos como así también la posible combinación de estos biomateriales, por

separado juntos, con otros elementos necesarios en la regeneración del hueso como lo son los factores de crecimiento y los osteoblastos.

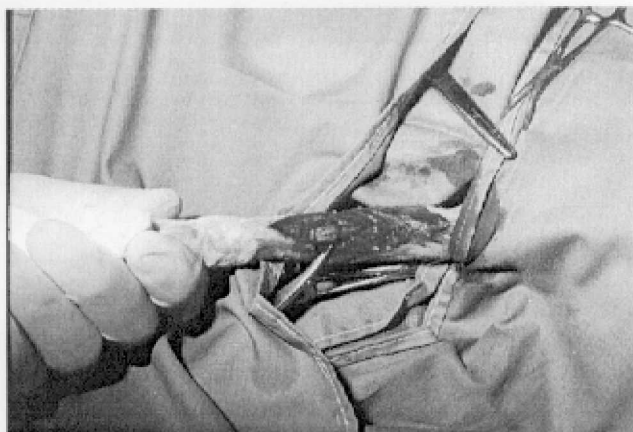
## CONCLUSIONES

La interacción de los biomateriales posibilitaron la reparación de los defectos de huesos largos. Los resultados obtenidos establecen conocimientos y experiencia para ser empleados en la cirugía ortopédica y plástica.

## FIGURAS



A



B



C



D

Fig. Nº 1 A) Miembro anterior acondicionado para ser intervenido; B) Luego de la incisión de la piel y los músculos se realizó osteotomía de la diafisis radial; C) Colocación de la membrana de PTFe; D) Sobre la membrana se colocaron los gránulos de vidrio.

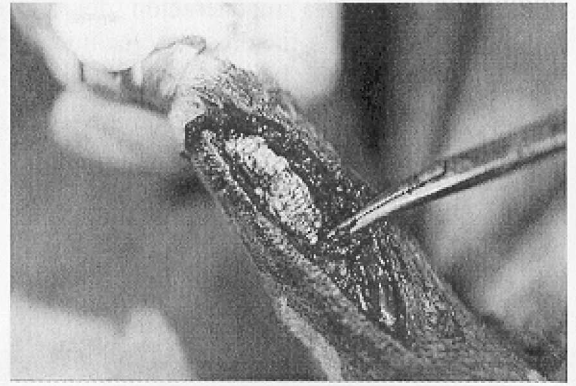
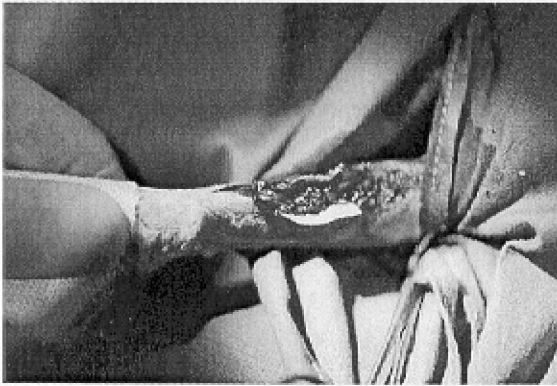


Fig. N° 1 E) Los gránulos se mezclaron con la sangre proveniente de la osteotomía; F) La membrana se encuentra envolviendo los cabos óseos y los gránulos.



A



B



C



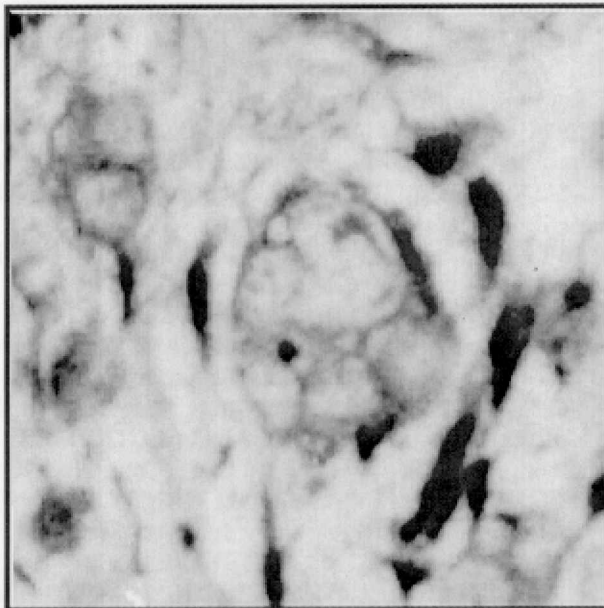
D

Fig. N° 3 Seguimiento radiológico de la reparación de uno de los defectos A) A las dos semanas se pueden diferenciar los gránulos de vidrio; B) A los 30 días los gránulos no se diferencian conformando una masa radiodensa; C) Luego de 90 días la masa radiodensa comienza a observarse unida a los cabos del hueso huésped; D) Tras 150 días de post-operatorio se observa la reparación del defecto.





**Fig. N° 5** Microfotografía del hueso neoformado donde se puede apreciar la presencia de tejido óseo y del tejido de granulación . (HEX 10)



**Fig. N° 6** Detalle ampliado de uno de los macrófagos en el que se puede observar numerosas vacuolas de gran tamaño.

## BIBLIOGRAFIA

- BARTEE, B.K.** -1990- The use of high density polytetrafluoroethylene membrane to treat osseous defects: clinical reports. *Implant Dent*; 4(1):21-6
- BECKER, W.; BECKER, B.E.** -1991- Treatment of mandibular 3-wall intrabony defects by flap debridement and expanded polytetrafluoroethylene barriers membranes. Long-term evaluation of 32 treated patients. *J Periodontol*; 64(11 Supl): 1138-44.
- BHAMBHANI, S.M.; BOLANOS, O.R.** -1992- Tissue reactions to endodontic materials implanted in the mandibles of guinea pigs. *Oral Surg Med Oral Pathol*; 76(4):493-501.
- BLUHM, A.E; LASKIN, D.M.** -1993- The effect of polytetrafluoroethylene cylinders on osteogenesis in rat fibular defects: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg.* 53(2):163-6.
- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K.** -1995- Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *Cleft Palate Craniofac. J*; 32(4):311-7.
- BOUCHARD, P.; OUHAYOUN, J.P.; NILVÉUS, R.E.** -1993- Expanded polytetrafluoroethylene membranes and connective tissue graft support bone regeneration for closing mandibular Class III furcations. *J Periodontol*; 64(12): 1193-8.
- BRUDER, S.; KRAUS, K.; GOLDBERG, V.; KADIYALA, S.** -1998- The effect of implants loaded with Atologous Mesenchymal Stem Cells on the Healing of Canine Segmental Bone Defects. *J Bone and Joint Surg.* 80-A:985-96.
- BUSER, D.; DULA, K.; BELSER, U.; HIRT, HP.; BERTHOLD, H.** -1994- Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent*; 13(1): 29-45
- BLASS, C.E. ET AL:** Static and dynamic cerclage wire analysis. *Vet Surg.* 15:181.
- BLANCHARD, C.;** -1995- Biomaterials: Body Parts of the Future. *Tech Today.* 5:155-167
- CAFFESSE, R.G.; NASJLETI, C.E.; MORRISON, E.C.; SANCHEZ, R.** -1993- Guided tissue regeneration: comparison of bioabsorbable and non-absorbable membranes. Histologic and histometric study in dogs. *J Periodontol* 65(6): 583-91.
- DUCHEYNE, P.; HENCH, LL.; KAGAN.** -1979- A II. At al. Short term bonding behavior of bioglass coating on metal substrate. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 94:155-160
- FURUSAWA, T.; MIZUNUMA, K.** -1997- Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone grafting material. *Implant Dentistry* 6:(2)93-101
- GATTI, A.M.; DUCHEYNE, P.; PIATELLI, A. ET AL.** -1993- Glass corrosion layers on bioactive glass granules of uniform size affect cellular function. In: Duchayne, P.; Christiansen, D.; eds. *Bioceramics.* Vol 6. Oxford, England: Butterworths p.396-400
- HÄMMERLE, C.H.; SCHMID, J.; LANG, N.; OLAH, A.J.** -1995- Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*; 53(2): 167-74
- HENCH, LL.; PASCHALL, H.A.** -1973- Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J. Biomed Mater. Res.* 7:25-42
- HENCH, LL.; SPLINTER, R.J.; ALLEN, W.C.; ET AL.** -1971- Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 5:117-141.
- HÜRZELER, M.B.; EINSELE, F.; LEUPOLZ, M.; SCHMITZ, H.J.; STRUB, J.R.** -1996- Bone augmentation using a synthetic bone graft in dogs. *J Oral Rehabil*; 21(4): 373-82
- HÜRZELER, M.B.; LEUPOLZ, M.; EINSELE, F.; SCHMITZ, H.J.; STRUB, J.R.** -1991- Treatment of exposed implant threads using a synthetic bone graft. *J Oral Rehabil*; 22(7):481-9
- JOHNSON, A.L.; EURELL, J.A.; LOSONSKY, J.M.; EGGER, E.L.** -1996- Biomechanics and biology of fracture healing with external skeletal fixation *Comp Cont Education* 20(4) 487:498
- JOVAVONIC, S.A.; SCHENK, R.K.; ORSINI, M.; KENNY, EB.** -1994- Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 10(1):23-31
- KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T.; URAGACHI, R.** -1993- Formation of jawbone tuberosities by guided tissue regeneration, an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res*; 5(4): 245-53
- KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T.** Role of periosteum in the formation of jaw bone. An experiment in the rat. *J Clin Periodontol*; 22(3):247-54.
- LANG, N.P.; HÄMMERLE, C.H.; BRÄGGER, U.; LEHMANN, B.; NYMAN, S.R.** -1995- Guided tissue regeneration in jawbone defects prior to implant placement. *Clin Oral Implants Reg.*; 5(2): 92-7.
- LINDE, A.; THORÉN, C.; DAHLIN, C.; SANDBERG, E.** -1990- Creation of new bone by

an osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg*; 51(8):892-7.

**LINDE, A.; ALEBERIUS, P.; DAHLIN, C.; BJURSTAM, K.; SUNDIN, Y.** -1992- Osteopromotion: a soft-tissue excision principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol*; 64(11 Suppl): 1116-28.

**MARKOWITZ, A.D.** -1967- *Cirugía Experimental y Fisiología Quirúrgica*. 5° ed. Traducido de la edición original *Experimental Surgery*. Editorial Interamericana, México D.F., México. p.291

**PINTO, V.S.; ZUOLO, M.L.; MELLOLING, J.T.** -1996- Guided bone regeneration in the treatment of a large periapical lesion: a case report. *Pract Periodontics Aesthet Dent*; 7(2):76-81.

**SANDER, L.; KARRING, T.** -1994. Healing of periodontal lesions in monkeys following the guided tissue regeneration procedure. A histological study. *J Clin Periodontol*; 22(4):332-7.

**SCHEPERS, E.J.G.; DUCHEYNE, P.** 1997- Bioactive Glass Particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle size ranges. *J. Of Oral Rehab.* 24:171-171

**SCHEPERS, E.; DE CLERCQ, DUCHEYNE, P.; ET AL.** -1991- Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J. Oral Rehabil.* 18:439-452.

**SCHEPERS, E.J.G.; DUCHEYNE, P.; BARBIER, L.; SCHEPERS, S.** -1993- Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dentistry* 2:(3)151-156

**SCHEPERS, E.; DE CLERCQ, M.; DUCHEYNE, P.** -1986- Histological evaluation of bulk and fibre-reinforced bioactive glass dental root implants in dogs. In: van Steenberghe, D.; Albrektsson, T.; Branemark, P-I, et al. (eds) *Current Clinical Practice Series*. Amsterdam: Excerpta Medica; 29:144-149

**SCHEPERS, E.; DE CLERCQ, M.; DUCHEYNE, P.** -1988. Histological and histomorphometrical analysis of bioactive glass and fibre reinforced bioactive glass dental root implants. *J Oral Rehabil.* 15:473-487.

**SCHEPERS, E.; DUCHEYNE, P.; DE CLERCQ, M.** -1989- Interfacial analysis of fibre-reinforced bioactive glass dental root implants. *J. Biomed Mater. Res.* 23:735-752

**SIGURDSSON, T.J.; HARDWICK, R.; BOGLE, G.C.; WIKESJÖ, U.M.** Periodontal repair in dogs: space provision by reinforced ePTFE membranes enhances bone and cementum regeneration in large supraalveolar defects. *J Periodontol*: 65(4):350-6.

**SIGURDSSON, T.J.; TATAKIS, D.M.; LEE, M.R.; WIKESJÖ, U.M.** -1996- Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluoroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol*; 66(6):511-21.

**SIMION, M.; DAHLIN, C.; TRISI, P.; PIATTELLI, A.** -1993- Qualitative and quantitative comparative study on different filling materials used in bone tissue regeneration: a controlled clinical study. *Int J Periodontics Restorative Dent*: 14(3): 198-215.

**SLATER, D.** -1993- *Textbook of Small Animal Surgery*. 2<sup>nd</sup> ed. Mosby Company Pub. Philadelphia, USA. p.1601-1602

**STONE, E.A. ET AL.** - 1996- Effects of rush pins on the distal femoral growth plate of young dogs. *Am J Vet Res* 42:261.

**TRITTEN, C.B.; BRAGGER, U.; FOURMOUSIS, I.; LANG, NP.** -1996- Guided bone regeneration around an immediate transmucosal implant for single tooth replacement: a case report. *Pract Periodontics Aesthet Dent*; 7(2):29-38.

**UYEDA, G.T.; VERNINO, A.R.; BRAND, J.W.** -1997- Combination treatment using decalcified freeze-dried bone allograft with guided tissue regeneration in human periodontal defects: Two cases reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*; 14(4):354-63.

**WALLACE, S.C.; GELLIN, R.G.; MILLER, M.C.; MISHKIN, D.J.** -1997- Guided tissue regeneration with and without decalcified freeze-dried bone in mandibular Class II furcation invasions. *J Periodontol*; 65(3): 244-54.

**WHITE, C. JR.; HANCOCK, E.B.; GARETTO, L.P.; KAFRAWY, A.A.** -1994- A histomorphometric study on the healing of Class III furcations utilizing bone labelling in beagles dogs. *J Periodontol*; 65(1); 84-92.

**ZELLIN, G.; GRITILLI-LINDE, A.; LINDE, A.** -1992- Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials*; 16(8):601-9.