

## Muestras de hueso sin descalcificar: descripción de técnica y utilidad basada en la literatura

### *Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature*

Jorge Cano -Sánchez <sup>(1)</sup>, Julián Campo-Trapero <sup>(2)</sup>, Juan Carlos Gonzalo-Lafuente <sup>(3)</sup>, Luis Alberto Moreno-López <sup>(4)</sup>, Antonio Bascones-Martínez <sup>(5)</sup>

(1) Doctor en Odontología. Practica privada. Madrid

(2) Profesor Asociado de Medicina y Cirugía Bucofacial. Facultad de Odontología. UCM

(3) Médico Odontólogo. Practica Privada. Madrid

(4) Profesor Asociado Patología Médica Bucofacial. Universidad Europea Madrid.

(5) Catedrático de Medicina Oral y Periodoncia. Facultad de Odontología. UCM

Correspondencia / Address:

Jorge Cano Sánchez

C/Carballino 21 1A Dcha

Alcorcón 28925

Madrid

Tfno: 916425991

E-mail: jo.cano@wanadoo.es

Recibido / Received: 16-05-2004 Aceptado / Accepted: 16-01--2005

#### Indexed in:

-Index Medicus / MEDLINE / PubMed  
-EMBASE, Excerpta Medica  
-Índice Médico Español  
-IBECs

Cano-Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo-Lafuente JC, Moreno-López LA, Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005;10:E74-E87.  
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1698-4447

## RESUMEN

La evaluación de las técnicas de regeneración ósea y de aposición ósea periimplantaria requiere técnicas de laboratorio que permitan valorar tejidos duros sin necesidad de descalcificarlos. En este trabajo describimos un procedimiento de corte-pulido (sistema EXAKT) para obtener muestras de hueso sin descalcificar y pretendemos establecer los procedimientos de estudio histológico e histomorfométrico que permiten la evaluación de las mismas. Se realiza una revisión de lo publicado en la literatura sobre la valoración histológica e histomorfométrica utilizando muestras sin descalcificar en aquellos procedimientos de cirugía e implantología oral en los que se produce regeneración ósea o aposición ósea sobre los implantes dentales. La técnica requiere de un tiempo prolongado para el procesado de las muestras y es indicación principal en investigación en biología ósea. La utilización de muestras sin descalcificar permite diferenciar el hueso inmaduro del maduro y cuantificar variables como la unión hueso-implante, la densidad del área ósea y la velocidad de la aposición ósea.

**Palabras clave:** Histología del hueso, histomorfometría ósea, EXAKT, muestras sin descalcificar.

## INTRODUCCION

La técnica sin descalcificar se ha impuesto en el análisis de las técnicas de aumento óseo de la cresta alveolar (distracción alveolar, elevación del seno sinusal, aplicación de factores de

## SUMMARY

The evaluation of bone regeneration and peri-implantary bone apposition requires laboratory techniques that allow the evaluation of hard tissues without needing to decalcify them. In this study, we describe the cutting-grinding procedure (EXAKT system) for obtaining samples of undecalcified bone and aim to establish the procedures for their histological and histomorphometric evaluation. A review is made of the literature on histological and histomorphometric evaluation using undecalcified samples in surgical and oral implantology procedures in which bone regeneration or bone apposition is produced on the dental implants. The technique is a lengthy process, and is principally indicated in the investigation of bone biology. The use of undecalcified samples allows the differentiation of immature from mature bone, and the quantification of variables such as the bone-implant interface, the density of the bone area and the speed of bone apposition.

**Key words:** Bone histology, bone histomorphometry, EXAKT, undecalcified samples.

## INTRODUCTION

The cutting-grinding technique for undecalcified bone has established itself in the analysis of bone augmentation techniques of the alveolar crest (alveolar distraction, sinus lift, application of growth factors, etc.), in the analysis of bone apposition on different biomaterials (heterologous, alloplastic, etc.), as well

crecimiento, etc...) en el análisis de la aposición ósea a diferentes biomateriales (heterólogos, aloplásticos, etc...), así como en la valoración y cuantificación de esta sobre los implantes aloplásticos. Se ha utilizado también para el estudio de tejidos dentarios y restauraciones o prótesis fija, así como para observar los tejidos blandos adyacentes (1,2).

Debido a que es un procedimiento de laboratorio que requiere un tiempo considerable (varias semanas dependiendo del tamaño de la muestra) no suele utilizarse para realizar diagnóstico en patología oral, siendo su principal indicación en estudios experimentales y su aplicación docente. De esta manera son escasos los estudios en los que esta técnica se ha utilizado para diagnosticar tumores óseos de los maxilares (3). Sin embargo puede ser de utilidad para valorar el origen (endodérmico o ectodérmico) de un tumor que invada el tejido óseo. También se ha utilizado para el estudio histológico de patologías óseas como la osteopetrosis o la osteomielitis (4).

La evaluación histológica del hueso se ha visto limitada durante años por las dificultades técnicas, de tal manera que antes de 1960 únicamente se realizaban técnicas de descalcificación que permitían obtener un tejido lo suficientemente blando para incluirlo en parafina y procesarlo en microtomo, sin embargo la aplicación de estas técnicas al tejido calcificado presenta una serie de inconvenientes (5):

- No se puede distinguir entre el hueso mineralizado y el no mineralizado y por lo tanto no es posible cuantificar el osteoide, o diferenciar el hueso inmaduro del maduro de manera precisa.
- En la mayoría de los casos se producen fenómenos de retracción de la interfase hueso mineralizado-médula ósea que dificultan la evaluación de las células que intervienen en el remodelado y por tanto la cuantificación histomorfométrica.
- Se imposibilita el estudio de la dinámica ósea mediante marcaje con fluorocromos, ya que distorsiona el depósito de calcio en la matriz amorfa.

Con el desarrollo técnico de medios duros de inclusión (monómeros plásticos), de microtomos y sistemas de corte especiales se ha permitido cortar el hueso sin descalcificar y de esta manera realizar nuevos estudios. Para el procesado de muestras con metales incluidos se ha utilizado la técnica de sección y pulido descrita por Donath y Breuner (6) usando el sistema de corte y pulido EXAKT (EXAKT Vertriebs, Norderstedt, Alemania) y el glicolmetacrilato (GMA) como medio de inclusión. La polimerización de metacrilato conlleva una reacción exotérmica que origina una alteración de las propiedades enzimáticas y de antigenicidad. Con la aparición de metilmetacrilatos (MMA) de última generación que permiten una polimerización a baja temperatura (menor de 20°C) se posibilita la utilización de estas muestras para realizar estudios de inmunohistoquímica (p.ej. Technovit 9100, Kulzer, Wehrheim) (7).

Este trabajo de revisión pretende realizar la descripción del procedimiento EXAKT de corte-pulido para obtener muestras óseas sin descalcificar y establecer tanto las características histológicas como histomorfométricas de interés que aparecen de manera habitual en los estudios de regeneración y curación ósea periimplantaria.

as in the evaluation and quantification of this apposition on alloplastic implants. It has also been used in the study of dental tissues and restorations or fixed prosthesis, as well as for observing adjacent soft tissues (1,2).

Since this is a laboratory procedure which requires a considerable amount of time (several weeks depending on the size of the sample), it is not normally used in the diagnosis of oral pathologies, being used principally in experimental studies and in teaching. Therefore, there are few studies in which this technique has been used to diagnose maxillary bone tumors (3). Nevertheless, it can be of use in evaluating the origin (endodermal or ectodermal) of a tumor invading bone tissue. It has also been used for the histological study of bone pathologies such as osteopetrosis or osteomyelitis (4).

The histological evaluation of bone has been limited for many years by the technical difficulties involved, in such a way that before 1960 the only decalcification techniques employed were those that obtained sufficiently soft tissue for embedding in paraffin and processing in microtome. Nevertheless, the application of these techniques to calcified tissue presents a series of disadvantages (5):

- it is not possible to distinguish between mineralized and non-mineralized bone, therefore it is not possible to quantify the osteoid, or to differentiate precisely between mature and immature bone.
- in the majority of cases, shrinkage phenomena are produced at the mineralized bone-bone marrow interface that impede the evaluation of the cells involved in remodeling, and therefore the histomorphometric quantification.
- the study of the bone dynamics by fluorochrome labeling becomes impossible, since calcium deposition in the amorphous matrix is distorted.

With the development of hard embedding media (plastic monomers), of microtomes and special cutting systems, it has become possible to cut undecalcified bone, and thereby to carry out new studies. For the processing of samples that include metals, the cutting-grinding technique, first described by Donath and Breuner (6) has been used, using the EXAKT cutting-grinding system (EXAKT Vertriebs, Norderstedt, Germany) and glycol-methacrylate (GMA) as an embedding medium. The polymerization of methacrylate involves an exothermic reaction that causes an alteration of the enzymatic activity and of protein antigenicity. With the appearance of the latest generation of methylmethacrylates (MMA) that allow polymerization at low temperatures (less than 20°C), the use of these samples for immunohistochemical studies is then possible (e.g. Technovit 9100, Kulzer, Wehrheim) (7).

This review article describes the EXAKT cutting-grinding system for obtaining undecalcified bone samples, and aims to establish both the histological and histomorphometric characteristics of interest that usually appear in studies of peri-implantary bone regeneration and healing.

## PROCESSING AND EVALUATION OF THE SAMPLES

The EXAKT system requires specific apparatus (Figure 1) to carry out the different phases of the procedure. The processing of

## PROCESADO Y EVALUACION DE LAS MUESTRAS

El sistema EXAKT necesita una aparatología específica (Figura 1) para desarrollar las diferentes fases del procedimiento. La técnica para el procesado del hueso sin descalcificar con el sistema EXAKT se lleva a cabo siguiendo las cuatro fases fundamentales de fijación, inclusión, sección-pulido y tinción previas a la evaluación de las muestras (2,5,8,9).

Durante la fijación el medio más usado es el formaldehído al 4% por su buena capacidad para mantener las células intactas. El problema que presenta este fijador es su transformación progresiva en ácido fórmico que desmineraliza el hueso, lo cual se evita tamponándolo con diferentes sustancias (carbonatos o fosfatos) siendo necesario verificar el pH para mantenerlo neutro. Para muestras pequeñas (menos de 5 mm de espesor) es suficiente con una fijación de 24-48 horas, mientras que para muestras más grandes o con hueso más denso se necesita de al menos 48-72 horas. En el caso de mantenerlo más tiempo es necesario almacenarlo en etanol al 70% para que no se produzca descalcificación (10). Si se van a realizar marcajes con fluorocromos el fijador utilizado será el etanol al 40% mantenido a 4°C (11).

Antes de realizar la inclusión las muestras son cortadas mediante la unidad de corte a espesores entre 2 y 4mm. En una primera fase se debe realizar la deshidratación de la muestra que tiene como finalidad la eliminación completa del agua y la grasa de la muestra mediante concentraciones crecientes de alcohol o acetona según la resina utilizada, y así permitir la correcta penetración del plástico (12).

Posteriormente se procede a la inclusión en el medio elegido. Los medios más utilizados son las resinas epoxi para microscopía electrónica y los derivados acrílicos para microscopía óptica, como son la resina de GMA (p. ej. Technovit 7200 VLC, Kulzer, Wehrheim, Alemania), resinas de MMA o la resina epóxica de Spurr (12). En el caso de estudio con inmunohistoquímica no se utiliza el GMA debido a que este no permite la desplastificación total de la muestra al hacer la tinción y no permitiría la correcta fijación de los anticuerpos sobre el tejido (7).

Para el corte de muestras óseas incluidas en metacrilato se utilizan diferentes sistemas de microtomos, aunque ninguno de ellos permite cortar metales. El sistema EXAKT, por el contrario, utiliza un sistema de corte (unidad de corte) (Figura 1) con banda de sierra de 0,1-0,3 mm de espesor con recubrimiento de diamante, que mediante un sistema de guías paralelas se desplazan con la incorporación de diferentes pesos permitiendo un corte gradual en función de la dureza de la muestra (2). De esta manera se obtienen muestras con un espesor de aproximadamente 180µm que pueden incorporar metales, cerámicas o tejido dentarios que posteriormente son pulidas hasta alcanzar espesores de 10 µm, lo que facilita la evaluación de las estructuras.

Previamente a la tinción, las secciones incluidas en MMA deben ser desplastificadas mediante peróxido de hidrógeno, ácido fórmico o acetona dependiendo de la tinción y seguidamente deben rehidratarse. Las muestras incluidas en GMA no son desplastificadas por lo que la tinción penetra con mayor dificultad que en las de MMA y por tanto evidencian una menor precisión de la morfología (12). Las tinciones utilizadas son las mismas que las utilizadas en muestras descalcificadas. De esta manera en estudios de histomorfometría suele utilizarse la modificación

undecalcified bone with the EXAKT system is made following the four fundamental phases of: fixation, embedding, cutting-grinding, and staining, prior to the evaluation of the samples (2,5,8,9).

The most common fixation medium is 4% formaldehyde, used for its capacity to maintain the cells intact. The problem associated with this medium is its progressive transformation into formic acid that demineralizes the bone, and which is avoided by buffering with different substances (carbonates or phosphates) while monitoring the pH to keep it neutral. For small samples (less than 5mm thick) a 24-48 hour fixation is sufficient, whereas for bigger samples or with denser bone at least 48-72 hours are required. If the samples are to be kept for longer periods, it is necessary to store them in 70% ethanol in order to prevent decalcification (10). If fluorochrome labeling is to be done then the fixation used will be 40% ethanol maintained at 4°C (11).

Before embedding, the samples are cut to thicknesses of between 2 and 4mm. In the first phase it is necessary to dehydrate the sample to completely eliminate the water and fat from the sample by increasing concentrations of alcohol or acetone according to the resin used, so allowing correct penetration of the plastic (12).

Following dehydration, the samples are embedded in the chosen medium. The most used materials are the epoxy resins for electronic microscopy and the acrylic derivatives for optical microscopy, such as GMA resin (e.g. Technovit 7200 VLC, Kulzer, Wehrheim, Germany), MMA resins or the Spurr epoxy resin (12). In the case of immunohistochemical studies, GMA is not used since this it does not allow the total deplasticization of the sample for staining, and would not allow the correct fixation of the antibodies on the tissue (7).

For the cutting of bone samples embedded in methacrylate, different systems of microtomes are in use, although none of them are able to cut metals. The EXAKT system, on the other hand, uses a cutting-grinding apparatus (Figure 1) with a diamond-coated saw band, 0.1-0.3 mm thick, which is moved by means of a system of parallel guides incorporating variable weights, allowing a gradual cut according to the hardness of the sample (2). Thus, samples are obtained with a thickness of approximately 180µm that can incorporate dental metals, ceramics or tissue, these are later ground to a thickness of 10 µm, facilitating the evaluation of the structures.

Prior to staining, the sections included in MMA must be deplasticized with hydrogen peroxide, formic acid or acetone depending on the stain used and then immediately rehydrated. The samples embedded in GMA are not deplasticized, so the stain penetrates with greater difficulty than in MMA, and therefore a lower morphologic precision is demonstrated (12). The stains used are the same as those used in decalcified samples. In this way, in histomorphometric studies, a modification of Masson-Goldner trichrome are usually used, which allows the clear observation of the bone cells, but has the tendency to overestimate the osteoid volume, especially when this is very thin. It stains the osteoid red, and the mineralized bone green. Toluidine blue colors the bone cells well, better than hematoxylin-eosin. The proteoglycans stain a more intense blue (due to the metachromatic reaction with the mucopolysaccharide acids) and therefore the immature

de Goldner del Tricrómico de Masson que permite observar con nitidez las células óseas, pero tiene tendencia a sobreestimar el volumen de osteoide, sobre todo cuando este tiene poco espesor. Tiñe el osteoide de rojo y el hueso mineralizado de verde. El azul de toluidina presenta una buena coloración de las células del hueso de manera superior a la hematoxilina-eosina. De azul más intenso se tiñen los proteoglicanos (debido a la reacción metacromática con los mucopolisacáridos ácidos) y por tanto aparece más intenso el hueso inmaduro (7).

La histomorfometría va a permitir la valoración cuantitativa mediante el recuento de células, la medición bidimensional (anchura, longitud, perímetro y área) y a partir de estos llegar a valores tridimensionales (espesor, superficie y volumen) de estructuras histológicas en diferentes tejidos. Actualmente se realiza mediante software informático específico para histomorfometría de tejidos. 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. La histomorfometría a su vez se puede realizar con parámetros estáticos o dinámicos en caso de realizar marcajes con fluorocromos separados en el tiempo (8,9). La nomenclatura y abreviaturas en histomorfometría ósea se realizan siguiendo las recomendaciones de la American Society for Bone and Mineral Research (1987) (13).

Los estudios histomorfométricos tridimensionales se basan en la estereología, aunque hay que considerar que la mayoría de las fórmulas estereológicas que se aplican al hueso, requieren que la estructura tenga una distribución isotrópica, es decir que exista una disposición homogénea de los elementos que componen la muestra (14). Esta disposición isotrópica ha sido aceptada con un mínimo error para las biopsias obtenidas de la cresta iliaca, pero no está totalmente aceptada para cualquier tipo de hueso, considerando el carácter general anisotrópico del tejido óseo (13).

Para lograr datos tridimensionales más precisos de una estructura isotrópica se aplica el principio de Cavalieri por el cual se obtiene el volumen total de una estructura a partir de cortes paralelos seriados. Una vez que se conoce el volumen total se puede saber la fracción del mismo que corresponde con cada corte. Este procedimiento requiere un tamaño muestral adecuado que va a depender de la estructura biológica a estudiar, y una recogida de las muestras de estudio de manera sistemática o al azar. La recogida de datos tridimensionales de una estructura anisotrópica obliga también a un tamaño muestral adecuado y a la realización de cortes en diferentes orientaciones (no seriados paralelos) (14).

## **VALORACION DE LA REGENERACION OSEA Y LA CURACION OSEA PERIMPLANTARIA**

El procedimiento de obtención de muestras de hueso sin descalcificar ha conseguido diversos resultados histológicos e histomorfométricos en diferentes estudios clínicos y experimentales (Tabla 1). Las muestras recogidas con esta técnica permiten valorar una serie de características histológicas del

bone appears more intense (7).

Histomorphometry allows quantitative evaluation by cell counting, obtaining a two-dimensional measurement (width, length, perimeter and area) and from these come the three-dimensional values (thickness, surface area and volume) of the histological structures in different tissues. Nowadays, this is carried out by specific computer software for tissue histomorphometry. The histomorphometric parameters result from the interrelation of a series of counts and measurements made in the bone tissue, permitting the quantitative definition of the structural and functional characteristics of the bone under normal, pathological or experimental conditions. The histomorphometry in turn can be carried out using static or dynamic parameters in the case of labeling with fluorochromes separated in time (8,9). The nomenclature and abbreviations used in bone histomorphometry follow the recommendations of the American Society for Bone and Mineral Research (1987) (13).

The three-dimensional histomorphometric studies are based on stereology, although it must be taken into account that the majority of the stereological formulae that are applied to bone require the structure to have an isotropic distribution, that is to say that the elements that compose the sample are arranged homogeneously (14). This isotropic arrangement has been accepted with a minimal error for biopsies obtained from the iliac crest, but are not fully accepted for any type of bone, due to the general anisotropic nature of bone tissue (13).

To achieve more precise three-dimensional data for an isotropic structure, Cavalieri's principle is applied, by which the total volume of a structure is obtained from a series of parallel cuts. Once the total volume is known, it is possible to calculate what fraction corresponds to each cut. This procedure requires a sample size suitable to the biological structure under study, and either a systematic or random sample selection. The capture of three-dimensional data for an anisotropic structure also calls for a suitable sample size, but with cuts made in different directions (not parallel) (14).

## **EVALUATION OF BONE REGENERATION AND PERI-IMPLANTARY BONE HEALING**

This procedure for obtaining undecalcified bone samples has obtained diverse histological and histomorphometric results in different clinical and experimental studies (Table 1). A series of histological characteristics of bone tissue can be evaluated from samples collected using this technique.

It allows the differentiation of the diverse cell lines that appear in bone tissue, observing the osteoclasts associated with the areas of resorption (trabeculas or osteons in resorption phase), osteoblasts associated with the osteoid or in a quiescent phase (lining cells), osteocytes and their relation with the canalicular system and other cellular phenotypes (principally fibroblasts and chondroblasts) (15,16). Certain cellular phenotypes can be observed more precisely, such as fusiform cells similar to fibroblasts (spindle-shaped fibroblast-like cells) characteristic of distraction (17,18). The embedding medium used affects the results when differentiating the various cell types. When staining with toluidine blue, it has been observed that in embedding

**Tabla 1.** Estudios clínicos/experimentales con muestras sin descalcificar

Autor	Biomodelo	Tamaño muestral (Localización)	Procedimiento analizado (Superficie)	Resultado histológico	Resultado histomorfo-métrico
Chappard y cols, 1999 (30)	Oveja	6 (Fémur)	Oseointegración (Mecanizada)	H.inmaduro a las 12 semanas H.laminar a las 24 semanas	BIC: 54,4% a las 12 semanas BIC: 83,8 % a las 24 semanas
Oda y cols, 2000 (34)	Perro	6 (Mandíbula)	Distracción alveolar (Mecanizada)	H.inmaduro a las 8 semanas H.laminar a las 12 semanas	BIC: 15,7% a las 8 semanas B.Ar/Tt.Ar: 39,3 % a las 8 semanas.
Block y cols.2000(31)	Perro	8 (Mandíbula)	Distracción alveolar	H.laminar a las 48 semanas	Ct.Th (Bucal):921 $\mu$ m a las 48 semanas
Klug y cols, 2001(32)	Clínico	10 (Mandíbula)	Distracción alveolar	H. Inmaduro a las 10 semanas	–
Nosaka y cols, 2002(33)	Perro	6 (Mandíbula)	Distracción alveolar horizontal	H.laminar a las 14 semanas	–
Zaffe y cols, 2002(26)	Clínico	10 (Mandíbula)	Distracción alveolar	H.inmaduro a las 8 semanas H.laminar a las 24 semanas	BV/TV: 50% a las 8 semanas
Raghobear y cols, 2002(17)	Clínico	10 (Mandíbula)	Distracción alveolar	H.laminar a las 8 semanas	–
Hallman y cols, 2002 (25)	Clínico	21 (Maxilar)	Biomateriales Oseointegración (Mecanizada)	H.l inmaduro y hueso laminar a las 24 semanas	BIC: 31,6% a las 24 semanas B.Ar/Tt.Ar: 41,7% a las 24 semanas
Zechner y cols, 2003(24)	Minipig	12 (Mandíbula)	Oseointegración (Oxidación anódica)	H.laminar a las 6 semanas	BIC: 24,2% a las 6 semanas B.Ar/Tt.Ar: 22,4 a las 6 semanas
Ivanoff y cols, 2003(23)	Clínico	20 (Maxilar y mandíbula)	Oseointegración (Oxidación anódica)	H.inmaduro (PFB) a las 15-26 semanas	BIC: 34% a las 15-26 semanas B.Ar/Tt.Ar:38% a las 15-26 semanas
Cano, 2004(18)	Perro	11 (Mandíbula)	Distracción alveolar	H.inmaduro (WB) a las 4 semanas H. inmaduro (PFB) a las 8 semanas	B.Ar/Tt.Ar : 36,6 % a las 4 semanas B.Ar/Tt.Ar : 58,7 % a las 8 semanas

BIC: Contacto Hueso-Implante

B.Ar/Tt.Ar: Área Ósea por Área Total

BV/TV: Volumen Óseo por Volumen de Tejido

Ct.Th: Espesor Cortical.

**Table 1.** Clinical/experimental studies with undecalcified samples

Author	Bio-model	Sample size (Location)	Procedure analyzed (Surface)	Histological result	Histomorphometric result
Chappard et al. 1999 (30)	Sheep	6 (Femur)	Osseointegration (Machined)	Immature bone at 12 weeks Lamellar bone at 24 weeks	BIC: 54.4% at 12 weeks BIC: 83.8 % at 24 weeks
Oda et al. 2000(34)	Dog	6 (Mandible)	Alveolar distraction (Machined)	Immature bone at 8 weeks Lamellar bone at 12 weeks	BIC: 15.7% at 8 weeks B.Ar/Tt.Ar: 39.3 % at 8 weeks.
Block et al. 2000(31)	Dog	8 (Mandible)	Alveolar distraction	Lamellar bone at 48 weeks	Ct.Th (Buccal):921 $\mu$ m at 48 weeks
Klug et al. 2001(32)	Clinical	10 (Mandible)	Alveolar distraction	Immature bone at 10 weeks	–
Nosaka et al. 2002(33)	Dog	6 (Mandible)	Horizontal Alveolar distraction	Lamellar bone at 14 weeks	–
Zaffe et al. 2002(26)	Clinical	10 (Mandible)	Alveolar distraction	Immature bone at 8 weeks Lamellar bone at 24 weeks	BV/TV: 50% at 8 weeks
Raghobear et al. 2002(17)	Clinical	10 (Mandible)	Alveolar distraction	Lamellar bone at 8 weeks	–
Hallman et al. 2002(25)	Clinical	21 (Maxilla)	Biomaterial Osseointegration (Machined)	Immature bone and lamellar bone at 24 weeks	BIC: 31.6% at 24 weeks B.Ar/Tt.Ar: 41.7% at 24 weeks
Zechner et al. 2003(24)	Minipig	12 (Mandible)	Osseointegration (Anodal oxidation)	Lamellar bone at 6 weeks	BIC: 24.2% at 6 weeks B.Ar/Tt.Ar: 22.4% at 6 weeks
Ivanoff et al. 2003(23)	Clinical	20 (Maxilla and mandible)	Osseointegration (Anodal oxidation)	Immature bone(PFB) at 15-26 weeks	BIC: 34% at 15-26 weeks B.Ar/Tt.Ar:38% at 15-26 weeks
Cano 2004(18)	Dog	11 (Mandible)	Alveolar distraction	Immature bone (WB) at 4 weeks Immature bone (PFB) at 8 weeks	B.Ar/Tt.Ar : 36.6 % at 4 weeks B.Ar/Tt.Ar : 58.7 % at 8 weeks

*BIC: Bone-Implant Contact*

*B.Ar/Tt.Ar: Bone Area over Total Area*

*BV/TV: Bone Volume over Tissue Volume*

*Ct.Th: Cortical Thickness*

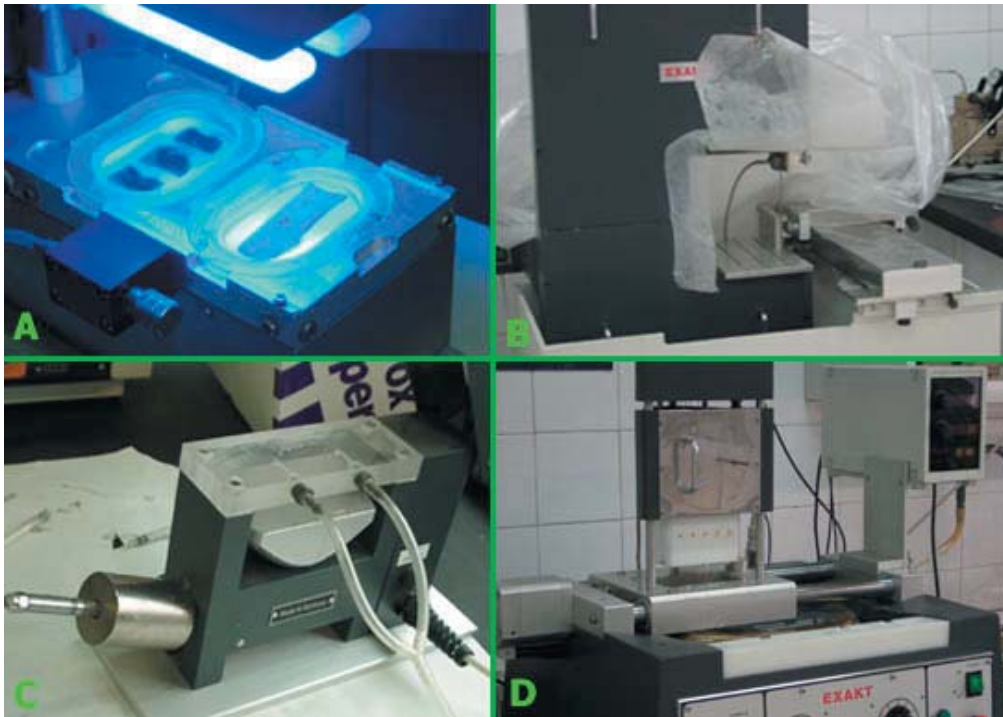
**Tabla 2.** Tipología del hueso

ESTRUCTURA MACROSCÓPICA	ESTRUCTURA MICROSCÓPICA	
<p><b>HUESO TRABECULAR / ESPONJOSO/ CANCELOSO. (Unidad Multicelular Básica- Trabécula)</b></p>	<p><b>HUESO INMADURO / TIPO I / PRIMARIO/ NEOFORMADO/ JOVEN / DE NUEVA FORMACIÓN.</b></p>	<p><b>HUESO ENTRELAZADO/ RETICULAR (WB, por Woven Bone).</b> Gran número de osteocitos globulares de gran tamaño con núcleo muy visible. Tinción intensa. Gran número de vasos. Distribución anárquica de células y matriz extracelular. Gran número de osteoblastos anexos con producción de osteoide. Desorden arquitectural de las fibras de colágeno (luz polarizada).</p>
		<p><b>HUESO DE FIBRAS PARALELAS/ COMPUESTO (PFB, por Parallel Fibered Bone). Trabécula Primaria.</b> Menor número de osteocitos elipsoidales y de menor tamaño. Tinción menos intensa que el H.entrelazado. Disposición más homogénea de las células y la matriz extracelular. Distribución paralela de las fibras de colágeno (luz polarizada).</p>
<p><b>HUESO CORTICAL/ COMPACTO. (Unidad Multicelular Básica- Osteona)</b></p>	<p><b>HUESO INMADURO / TIPO I / PRIMARIO/ NEOFORMADO/ JOVEN / DE NUEVA FORMACIÓN.</b></p>	<p><b>HUESO ENTRELAZADO/ RETICULAR (WB, por Woven Bone).</b> Gran número de osteocitos globulares de gran tamaño con núcleo muy visible. Tinción intensa. Gran número de vasos. Distribución anárquica de células y matriz extracelular. Gran número de osteoblastos anexos con producción de osteoide. Desorden arquitectural de las fibras de colágeno (luz polarizada).</p>
		<p><b>HUESO DE FIBRAS PARALELAS/ COMPUESTO (PFB, por Parallel Fibered Bone). Osteona Primaria.</b> Menor número de osteocitos elipsoidales y de menor tamaño. Tinción menos intensa que el H.entrelazado. Disposición más homogénea de las células y la matriz extracelular agrupados alrededor de un vaso más ancho que el conducto de Havers. Distribución paralela de las fibras de colágeno (luz polarizada).</p>
	<p><b>HUESO LAMINAR/ MADURO/ TIPO II/ SECUNDARIO/ NATIVO/ ANTIGUO(LB, por Lamellar Bone). Osteona Secundaria.</b> Menor número de osteocitos difíciles de ver dentro de la laguna osteocítica. Tinción menos intensa que el H. de fibras paralelas. Disposición de las células y la matriz extracelular en láminas concéntricas alrededor de los conductos de Havers. Distribución paralela de las fibras de colágeno (luz polarizada).</p>	

**Table 2. Bone Typology**

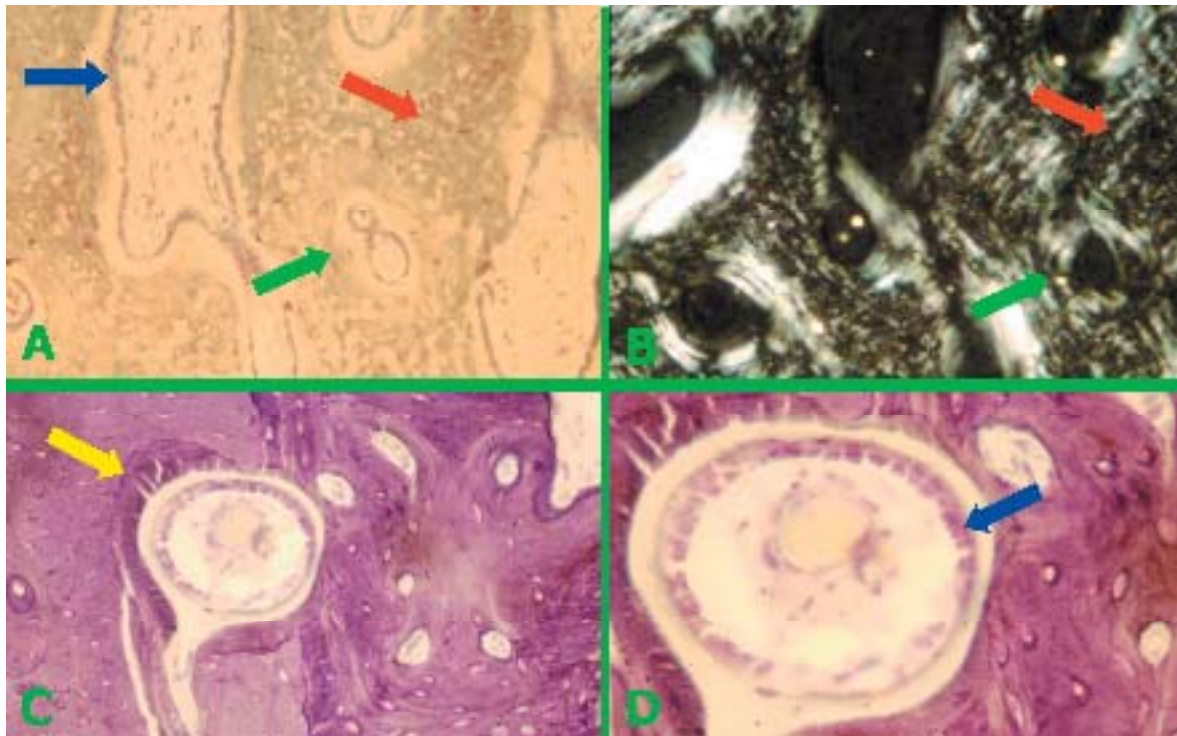
MACROSCOPIC STRUCTURE	MICROSCOPIC STRUCTURE	
<p>CANCELLOUS / SPONGY / TRABECULAR BONE. (Basic Multicellular Unit - Trabecula)</p>	<p>NEWLY FORMED/ YOUNG/ PRIMARY/TYPE I/ IMMATURE BONE.</p>	<p>RETICULAR/ WOVEN BONE (WB). Many large globular osteocytes with highly visible nuclei. Intense staining. Large number of vessels. Anarchic cell and extracellular matrix distribution. Many attached osteoblasts with osteoid production. Architectural chaos of collagen fibers (polarized light).</p>
		<p>COMPOUND/PARALLEL FIBERED BONE (PFB). Primary Trabecula. Fewer ellipsoidal osteocytes and smaller in size. Less intense staining than in WB. More homogeneous arrangement of cells and the extracellular matrix. Parallel distribution of the collagen fibers (polarized light).</p>
	<p>OLD/ NATIVE/ SECONDARY/ TYPE II/ MATURE/ LEMELLAR BONE (LB). Secondary Trabecula. Fewer osteocytes, difficult to see within the osteocytic lagoon. Less intense staining than with PFB. Cells and extracellular matrix arranged in parallel laminae. Parallel distribution of collagen fibers (polarized light).</p>	
<p>COMPACT/ CORTICAL BONE. (Basic Multicellular Unit - Osteon)</p>	<p>NEWLY FORMED/ YOUNG/ PRIMARY/TYPE I/ IMMATURE BONE.</p>	<p>RETICULAR/ WOVEN BONE (WB). Many large globular osteocytes with highly visible nuclei. Intense staining. Large number of vessels. Anarchic cell and extracellular matrix distribution. Many attached osteoblasts with osteoid production. Architectural chaos of collagen fibers (polarized light).</p>
		<p>COMPOUND/PARALLEL FIBERED BONE (PFB). Primary Osteon. Fewer ellipsoidal osteocytes and smaller in size. Less intense staining than in WB. More homogeneous arrangement of cells and the extracellular matrix grouped around a vessel wider than the Havers conduit. Parallel distribution of the collagen fibers (polarized light).</p>
	<p>OLD/ NATIVE/ SECONDARY/ TYPE II/ MATURE/ LEMELLAR BONE (LB). Secondary Osteon. Fewer osteocytes, difficult to see within the osteocytic lagoon. Less intense staining than with PFB. Cells and extracellular matrix arranged in parallel laminae in concentric laminae around the Havers conduit. Parallel distribution of collagen fibers (polarized light).</p>	





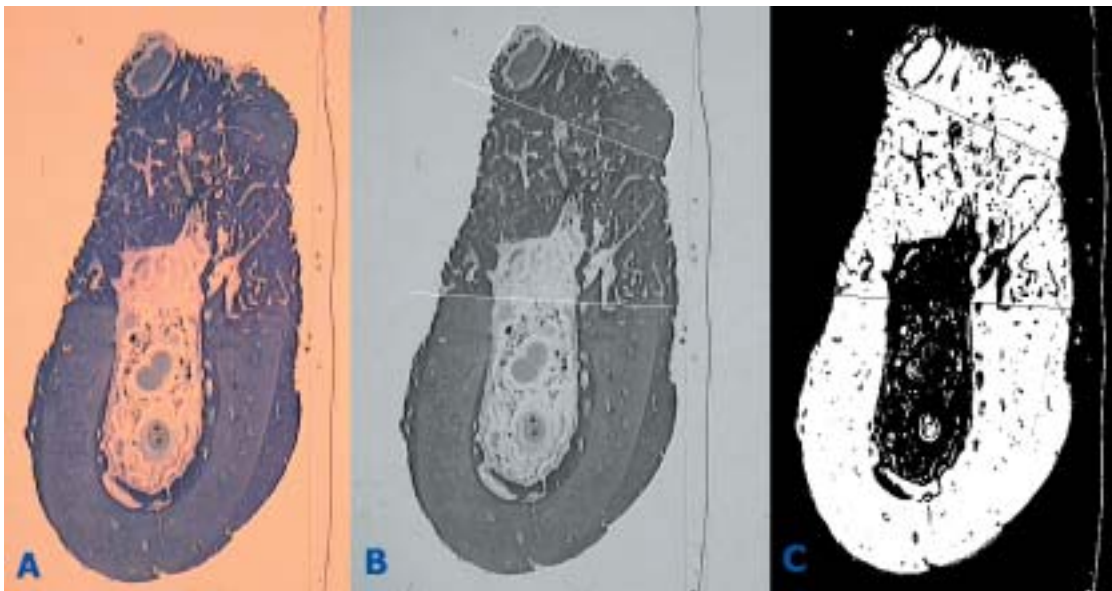
**Fig. 1.** Maquinaria del sistema EXAKT. A- Unidad de polimerización. B- Unidad de corte. C- Unidad de prensado adhesivo. D- Unidad de pulido.

*EXAKT system apparatus. A- Polymerization unit. B- Cutting unit. C- Adhesive press. D- Grinding unit.*



**Fig. 2.** Hueso regenerado en cámara de distracción tras distracción alveolar (mandíbula de perro beagle) A- Se observan osteoblastos en empalizada (flecha azul), WB (flecha roja) y PFB (flecha verde)(x200, Azul de Toluidina). B-Misma preparación observada con luz polarizada. Se observa la disposición orientada de las fibras de colágeno en el PFB(flecha verde).C- Osteona secundaria en limite de cámara con hueso nativo. Línea ondulada de inversión (flecha amarilla)(x200, Azul de Toluidina). D- Osteoblastos cuboidales en empalizada (flecha azul) con producción de osteoide(flecha azul)(x400, Azul de Toluidina).

Bone regenerated in distraction chamber following Alveolar distraction (mandible of beagle) A – Palisaded osteoblasts are observed (blue arrow), WB (red arrow) and PFB (green arrow) (x200, Toluidine blue). B – The same preparation observed under polarized light. The orientation of the collagen fibers in the PFB are observed (green arrow). C – Secondary osteon within the chamber limits with native bone. Wavy line of inversion (yellow arrow) (x200, Toluidine blue). D – Palisaded cuboidal osteoblasts (blue arrow) with osteoid production (blue arrow) (x400, Toluidine blue).



**Fig. 3.** Morfometría de densidad de área ósea en distracción alveolar (mandíbula de perro). A- Imagen de muestra capturada (x 5). B- Delimitación con líneas de zonas de estudio y conversión en grises. C- Segmentación  
*Density morphometry in bone area in alveolar distraction (dog mandible). A – Captured sample image (x5). B – Delimitation with lines of studied areas and conversion to gray scale. C – segmentation.*

tejido óseo.

Permite diferenciar los diversos *linajes celulares* que aparecen en el tejido óseo, pudiéndose observar los osteoclastos asociados a las zonas de reabsorción (trabéculas u osteonas en fase de reabsorción), osteoblastos asociadas al osteoide o en fase quiescente (células de revestimiento), osteocitos y su relación con el sistema canalicular y otros fenotipos celulares (fibroblastos y condroblastos principalmente) (15,16). Se pueden observar de manera más precisa determinados fenotipos celulares como son células fusiformes similares a fibroblastos (spindle-shaped fibroblast-like cells) características de la distracción (17,18). El medio de inclusión utilizado va a influir a la hora de diferenciar los diferentes tipos celulares. Se ha observado con tinción de azul de toluidina que en la inclusión con MMA convencional es más difícil diferenciar los osteoblastos del osteoide que cuando se usa un MMA que polimeriza a baja temperatura (7). Con estas muestras se ha descrito que los osteoclastos de los pacientes con osteopetrosis aparecen alterados en su morfología y función, de tal manera que se presentan sin el borde plegado característico lo que parece que disminuiría su capacidad de desmineralización de la matriz por no ser capaces de degradarla posteriormente (4).

Se consigue también diferenciar el hueso neoformado inmaduro del hueso remodelado maduro. Desde el punto de vista macroscópico y microscópico se distinguen diferentes tipos de huesos que corresponden a diversas fases de maduración, y cuyas características se describen en la Tabla 2 (9,19, 20). El hueso inmaduro va a presentar una tinción más intensa que el hueso maduro, y las líneas de cementación que presenta tienen un trazado liso y no ondulado como ocurre en el hueso laminar formado tras remodelación (Figura 2). La diferenciación entre

with conventional MMA it is more difficult to differentiate the osteoblasts of the osteoid than with MMA that polymerizes at low temperatures (7). With these samples it has been described that in patients with osteopetrosis, the osteoclasts are altered in morphology and function, in such a way that they appear without the characteristic folded edge which seems to increase the demineralization capacity of the matrix being unable to degrade it later (4).

Differentiation of the immature newly formed bone from the mature remodeled bone is also achieved. From the macroscopic and microscopic point of view, different types of bones are distinguished, corresponding to various phases of maturation, and whose characteristics are described in Table 2 (9,19, 20). Immature bone presents a more intense staining than mature bone, and the lines of cementation have a smooth, straight contour, as occurs in the lamellar bone formed after remodeling (Figure 2). The differentiation between the immature Parallel Fibred Bone (PFB) and the lamellar bone is difficult to determine, and on occasions have been confused (17). With these samples it is possible to chronologically evaluate the formation and maturation of the bone. In this way, a study of regeneration of defects filled with autologous bone in rabbit calvaria (21) demonstrated that at one week of healing there was a predominance of Woven Bone (WB) whereas the grafted particles appeared with empty osteocytic lagoons. At two weeks a significant proportion of PFB appeared, beginning in a particle remodeling process. At four weeks the first areas with lamellar bone were observed and the defects were totally filled when the particles were small ( $0.5\text{-}2\text{ mm}^3$ ), but with a persistence of areas of connective tissue when the particles were larger ( $10\text{ mm}^3$ ) or when there were no particles.

el hueso inmaduro tipo PFB (PFB, por Parallel Fibered Bone) y el hueso laminar es de difícil determinación y en ocasiones han sido confundidos (17). Con estas muestras se puede valorar la formación y maduración del hueso de manera cronológica. De este modo, un estudio con regeneración de defectos rellenos con hueso autólogo en calota de conejo (21) evidenció que a la semana de curación existía un predominio de WB (WB, por Woven Bone) mientras que las partículas injertadas aparecían con lagunas osteocíticas vacías. A las 2 semanas aparecen una proporción importante de PFB empezando en un proceso de remodelado de las partículas. A las 4 semanas se observan las primeras zonas con hueso laminar y los defectos estaban totalmente rellenos cuando las partículas eran pequeñas ( $0,5-2 \text{ mm}^3$ ) pero con persistencia de zonas de tejido conectivo cuando las partículas eran mayores ( $10 \text{ mm}^3$ ) o cuando no había partículas.

El obtener muestras sin descalcificar permite también diferenciar y cuantificar el osteoide o matriz ósea sin mineralizar. El osteoide puede observarse en forma de finos ribetes de unas 10 micras de espesor que revisten la superficie de algunas trabéculas y tapizan algunas cavidades intracorticales y va a ser un indicador de la actividad osteoblástica (22).

Se consigue valorar la integridad del biomaterial y cuantificar el hueso que crece en la interfase. Esto permite analizar la estructura de los recubrimientos implantarios, y la capacidad de reabsorción de los materiales osteoconductores utilizados en la regeneración ósea. Se ha observado que el tratamiento de la superficie mediante oxidación anódica libera ciertas partículas que son capturadas por diferentes células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, etc...), aunque las consecuencias de tales "desprendimientos" del recubrimiento de óxido todavía son desconocidas (23). Este tipo de muestras sin descalcificar evidencia también el proceso de reabsorción que se produce en los recubrimientos de hidroxiapatita (24), así como el proceso reabsortivo que idealmente se debe producir en los materiales de injerto. Se ha observado que los injertos de hueso bovino no se reabsorben incluso cuando han transcurrido largos periodos de curación y se mantienen separados de las superficies implantarias (25).

Se han utilizado estas muestras para realizar estudios de histoquímica e inmunohistoquímica y por tanto determinar diferentes proteínas que intervienen en la biología ósea. La expresión de fosfatasa alcalina (AP, por Alkaline Phosphatase) se ha visto que es intensa a los 60 días de consolidación tras distracción, mientras que a los 88 días es más intensa la expresión de fosfatasa ácida (TRAP, Tartrate Resistant Acid Phosphatase) lo que indica el aumento del proceso de remodelado en este segundo periodo (26). Se ha podido observar también la expresión de proteínas indicativas de la diferenciación ósea, como son la osteocalcina (OC, por Osteocalcine), osteopontina (OPN, por osteopontin), sialoproteína ósea (BSP, por Bone Sialoprotein) y osteonectina (ONN, por osteonectin) (7).

Röser y cols (27) utilizaron la cámara de recogida de hueso diseñada por Albrektsson para realizar un estudio inmunohistoquímico de tibia de conejo desde la segunda hasta la quinta semana de curación, pudiendo evidenciar que a medida que aumentaba la maduración tisular disminuía la proliferación tisular y por tanto la expresión de proteínas. La BSP se expresa

Obtaining undecalcified samples also allows the differentiation and quantification of the osteoid or unmineralized bone matrix. The osteoid can be observed in the shape of thin edges approximately 10 microns thick that line the surface of some trabeculae and cover some intracortical cavities and serve as an indicator of osteoblastic activity (22).

It is possible to evaluate the biomaterial integrity and to quantify the bone that grows at the interface. This permits the analysis of the structure of the implant coatings, and the resorption capacity of the osteoconductor materials used in bone regeneration. It has been observed that treatment of the surface by means of anodal oxidation liberates certain particles that are captured by different inflammatory cells (macrophages, lymphocytes, etc.), though the consequences of such "detachings" of the oxide coating are still unknown (23). This type of undecalcified sample also demonstrates the resorption process that is produced in the hydroxyapatite coatings (24), as well as the resorption process that should ideally be produced in the graft material. It has been observed that the grafts of bovine bone are not resorbed even after long periods of healing and remain separated from the implant surfaces (25).

These samples have been used to carry out histochemical and immunohistochemical studies and therefore to determine different proteins that intervene in bone biology. The alkaline phosphatase expression (AP) has been seen to be intense at 60 days of consolidation after distraction, whereas at 88 days the phosphatase acid expression is more intense (Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP)) which indicates the increase in the remodeling process during this second period (26). It has also been possible to observe the expression of proteins indicative of bone differentiation, such as osteocalcin (OC), osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP) and osteonectin (ONN) (7).

Röser et al. (27) used the bone growth chamber, designed by Albrektsson, to carry out an immunohistochemical study of rabbit tibia from the second to the fifth week of healing. They were able to demonstrate that as the tissular maturation increased, the tissular proliferation and therefore the expression of proteins decreased. BSP expresses for different cells at 2 weeks, carrying out an important function of crystal enucleator, whereas at 5 weeks only osteoblasts are weakly expressed. OPN appears at 2 weeks in the extracellular matrix which indicates its early role in cellular adhesion. ONN was only detected in the osteoblasts and was observed included in the center of the trabeculae, indicating its capacity to bond collagen and hydroxyapatite.

The procedure also allows the quantification of a series of static or dynamic histomorphometric variables described by the American Society for Bone and Mineral Research (13). In the majority of the histomorphometric studies, two-dimensional variables are obtained, although they are sometimes quantified as three-dimensional, which creates a certain confusion in the interpretation of the results.

*The Density of Bone Area* (Bone Area over Total Area (B.Ar/Tt.Ar)) determines the quantity of mineralized bone arranged both in trabeculae and osteons in relation to the area of total tissue. This is a static two-dimensional variable that becomes a three-dimensional value with the Bone Volume (Bone Volume over Total Volume (BV/TV)). It indicates the density of bone

por diferentes células a las 2 semanas realizando una importante función de enucleador de cristales, mientras que a las 5 semanas solo se expresan los osteoblastos de manera débil. La OPN aparece a las 2 semanas en la matriz extracelular lo cual indica su función precoz en la adhesión celular. La ONN se detectó únicamente en los osteoblastos y se observaba incluida en el centro de las trabéculas indicando su habilidad para unir el colágeno y la hidroxiapatita.

El procedimiento permite también la cuantificación de una serie de variables histomorfométricas estáticas o dinámicas descritas por la American Society for Bone and Mineral Research (13). En la mayoría de los estudios histomorfométricos se obtienen variables bidimensionales aunque a veces se cuantifican como tridimensionales, lo cual crea cierta confusión en la interpretación de los resultados.

*La Densidad de Área Ósea* (B.Ar/Tt.Ar, por Bone Area per Total Area) determina la cantidad de hueso mineralizado dispuesto tanto en trabéculas como osteonas con relación a la zona de tejido total. Se trata de una variable estática bidimensional que se corresponde en valor tridimensional con el Volumen Óseo (por Bone Volume per Total Volume, BV/TV). Nos va a indicar la densidad de hueso que se encuentra en el área regenerada. Con el software de histomorfometría se puede obtener el valor de esta variable mediante la conversión de la imagen en tonos de grises y la segmentación del tejido seleccionado (Figura 3). El valor de esta variable se modifica en los procesos de regeneración ósea debido al remodelado continuo del hueso. De esta manera se ha observado en humanos (26) que en la regeneración por distracción existe un valor del 50% a las 8 semanas de consolidación mientras que disminuye a un 37% a las 12 semanas debido a un mayor actividad osteoclástica.

La diferencia de densidad ósea ha sido valorada en diferentes momentos dentro de las roscas de los implantes e inmediatamente fuera (superficie-oxidación anódica; curación-3,6 y 12 semanas; mandíbula de minipig)(24). En la zona entre las roscas fue de 6,3%, 15,4% y 38,4% a las 3, 6 y 12 semanas respectivamente mientras que exterior a las mismas fue de 13,5% 22,4% y 36,2% respectivamente. Los datos indican una neoformación periimplantaria que se estabiliza en este biomodelo a las 12 semanas.

*La Unión Hueso-Implante* (BIC, por Bone Implant Contact; BS/IS, por Bone Surface per Implant Surface) determina la cantidad de hueso mineralizado que se encuentra en íntimo contacto con la superficie del implante. Se trata de una longitud y por tanto es una variable estática bidimensional que se corresponde en valor tridimensional con la Superficie Ósea (por Bone Surface, BS).

Las mediciones histomorfométricas de la osteointegración van a depender de varios factores que hacen difícil la estandarización y comparación de los diferentes resultados presentados, así intervienen factores como el área ósea analizada (línea de cementación en contacto con implante, hueso entre roscas, o hueso adyacente), dirección del corte histológico, la elección de las "3 consecutivas mejores roscas", colocación de implante en hueso cortical o trabécula (maxilar o mandíbula), valoración en zona coronal o apical del implante y la valoración en zona lingual o vestibular del implante (28).

found in the regenerated area. With histomorphometry software it is possible to obtain the value of this variable by means of the conversion of the image in gray tones and the segmentation of the selected tissue (Figure 3). The value of this variable is modified in the process of bone regeneration due to the continued remodeling of the bone. In humans it has been observed that in regeneration by distraction, there was a value of 50% at 8 weeks of consolidation, which decreased to 37% at 12 weeks due to a greater osteoclastic activity(26).

The difference in bone density has been evaluated at different moments, both inside the threads of the implants and immediately outside the implant (surface - anodal oxidation; healing - 3, 6 and 12 weeks; mandible of minipig) (24). In the area between the threads it was 6.3%, 15.4% and 38.4% at 3, 6 and 12 weeks respectively, whereas on the exterior it was of 13.5% 22.4% and 36.2% respectively. The data indicate a peri-implantary neoformation that stabilizes in this biomodel at 12 weeks.

*The Bone - implant contact* (BIC), (Bone Surface over Implant Surface (BS/IS)) determines the quantity of mineralized bone found in close contact with the surface of the implant. This is a measurement of length and is therefore a static two-dimensional variable that becomes a three-dimensional value with the Bone Surface (BS).

The histomorphometric measurement of osteointegration depends on several factors that make the standardization and comparison of the different results difficult. Many factors such as the bone area analyzed (line of cementation in contact with the implant, bone between threads, or adjacent bone), direction of the histological cut, the selection of the 'best 3 consecutive threads', insertion of implant into cortical or trabecula bone (maxilla or mandible), evaluation in coronal or apical area of the implant, and the evaluation in the lingual or vestibular area of the implant, all have influence on the results (28).

Concerning the bone area analyzed, it has been observed experimentally that the bone is denser in the 2mm outside the threads (92.6%) than in both the bone between them (76.9%) and at the surface of the implant (59.2%) (surface - machined; healing - 3 months; biomodel - mandible of dog). In accordance with these findings, the hypothesis is made that the radiological evaluation is related more to the adjacent bone, and not so much to the bone between threads or the line of cementation, which can have a lower bone density, and which therefore put the radiological evaluation into question (28). With respect to the healing in cortical or trabecular bone, it has been observed that the percentage of BIC and of B.Ar/Tt.Ar is 9% higher in the mandible than in the maxilla (surface - machined; healing - 6 months; model - mandible of monkey (29). Another study presented samples in which a higher apposition of lamellar bone was observed on the bottom and the sides of the screws than on the point of the screws (surface - anodized oxidation; healing - 12 weeks, biomodel - minipig) (24).

*The Mineral Apposition Rate* (MAR), indicates the speed of osteoid deposition and therefore the rate of bone production.

The fluorochromes used (tetracycline, xylenol, calcein, alizarin) are molecules that have an affinity for calcium when it is arranged amorphyously, which leads to their adherence to the mineralization fronts produced during bone remodeling (8).

En cuanto al área ósea analizada se ha observado experimentalmente que el hueso es más denso en los 2mm exteriores a las roscas (92,6%) que en el hueso entre roscas (76,9%) y que en la superficie del implante (59,2%) (superficie- mecanizados; curación-3 meses; biomodelo- mandíbula de perro). Según estos hallazgos se establece la hipótesis que la evaluación radiológica se relaciona más con el hueso adyacente, y no tanto con el hueso entre roscas o la línea de cementación, que pueden tener una menor densidad ósea, por lo que se cuestiona la valoración radiológica (28). En cuanto a la curación en hueso cortical o trabecular, se ha observado que el porcentaje de BIC y el de B.Ar/Tt.Ar es de un 9% superior en la mandíbula que en el maxilar (superficie-mecanizado; curación-6meses; modelo-mandíbula de mono) (29). Otro estudio presentó muestras en las que se observaba una mayor aposición del hueso laminar sobre el fondo y los flancos de las roscas que sobre el pico de las roscas (superficie-oxidación anodinada; curación 12 semanas, biomodelo-minipig) (24).

*El Índice de Aposición Mineral* (MAR, por Mineral Apposition Rate,) indica la velocidad en la que se produce la deposición de osteoide y por tanto la producción ósea.

Los fluorocromos utilizados (tetraciclinas, xilenol, calceína, alizarina) son moléculas que tienen afinidad por el calcio cuando está dispuesto de manera amorfa lo que conlleva que se fije en los frentes de mineralización que se producen durante la remodelación ósea (8). Con la determinación de marcajes que emiten diferentes tonos de fluorescencia bajo luz ultravioleta, se puede calcular la velocidad de aposición ósea en la zona de regeneración ósea. Se realiza mediante la medición de la distancia entre dos consecutivos marcajes dividido por el tiempo transcurrido entre ambos marcajes.

En humanos las tetraciclinas suelen administrarse por vía oral mientras que en experimentación animal son dosificados de manera intravenosa, subcutánea o intramuscular. La anchura de banda marcada en el hueso va a depender del tiempo que la substancia circule por la sangre y la vía de administración, de esta manera la vía parenteral siempre evidencia marcajes más claros, y por otro lado substancias con una vida media plasmática más corta (calceína o alizarina) tienen unos niveles más claros que las que tienen una vida media más larga (tetraciclinas). Los protocolos de administración de los marcajes deben ser precisos según el biomodelo utilizado para evitar el error de escape del marcaje y el error de inclinación de la muestra. Ambos errores se minimizan mediante la reducción del intervalo de marcadores (11)

Tanto la intensidad del marcaje con tetraciclinas como el MAR se han observado mayores en la zona próxima al implante que a cierta distancia del implante ya sea a los 3 como a los 6 meses de curación (superficie- mecanizados; curación-3 y 6 meses; biomodelo- fémur de oveja). Esto implica un mayor proceso de remodelado óseo en zonas cercanas al implante que en el remodelado normal (30).

With the use of labels that emit different tones of fluorescence under ultraviolet light, it is possible to calculate the speed of bone apposition in the area of bone regeneration. This done by the measuring the distance between two consecutive labels, divided by the time elapsed between them.

In humans, tetracycline is usually administered orally, whereas in animal experimentation it is given intravenously, subcutaneously or intramuscularly. The band width marked in the bone will depend on the time that the substance circulates in the blood and the method of administration, with the parenteral route always demonstrating clearer markings. On the other hand, substances with a shorter plasmatic half-life (calcein or alizarin) have clearer levels than those with a longer half-life life (tetracycline). The administration protocols of the markings should be precise according to the biomodel used in order to avoid both leakage of the label and inclination of the sample. Both errors are minimized by reducing the label interval (11).

Both the intensity of the labeling with tetracycline and the MAR have been observed to be greater in the area close to the implant than at a certain distance from the implant, whether at 3 or 6 months of healing (surface - machined; healing - 3 and 6 months; biomodel - femur of sheep). This implies a greater process of bone remodeling in areas closer to the implant than in normal remodeling (30).

**BIBLIOGRAFIA/REFERENCES**

1. Barth E, Johansson, Albrektsson T. Histologic comparison of ceramic and titanium implants in cats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5:227-31.
2. Rohrer MD, Schubert CC. The cutting-grinding technique for histologic preparation of undecalcified bone and bone-anchored implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74:73-8.
3. Hillmann G, Hillman B, Donath K. Enzyme, lectin and immunohistochemistry of plastic embedded undecalcified bone and other hard tissues for light microscopic investigations. *Biotech Histoch* 1991;4:185-93.
4. Semba I, Ishigami T, Sugihara K, Kitano M. Higher osteoclastic demineralization and highly mineralized cement lines with osteocalcin deposition in mandibular cortical bone of autosomal dominant osteopetrosis type II: ultrastructural and undecalcified histological investigations. *Bone* 2000;3:389-95
5. Baron R, Vignery A, Neff L, Silverglate A, Santa María A. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. En: Becker RR, eds. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. CRC Press; 1993. p. 13-37.
6. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11:318-26.
7. Yang R, Davies CM, Archer CW, Richards RG. Immunohistochemistry of matrix markers in technovit 9100 new embedded undecalcified bone sections. *Eur Cell Mat* 2003;6:57-71.
8. Serrano S, Mariñoso ML. Bases histológicas de la histomorfometría ósea En: Serrano S, Aubia J, Mariñoso ML, eds. *Patología sea metabólica*. Barcelona: Sandoz; 1990. p. 56-69.
9. Eriksen Ef, Axelrod DW, Melsen F, eds. *Bone histomorphometry*. New York: Raven Press; 1994.
10. An YH, Gruber HE. Introduction to experimental bone and cartilage histology. En An YH, Martin KL, eds. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa: Humana Press; 2003. p. 3-35.
11. Erben RG. Bone-labeling techniques. En: An YH, Martin KL, eds. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa: Humana Press; 2003. p. 99-177.
12. Scarano A, Orsini G, Piatelli A. Infiltration techniques and results in different types of resin. En: An YH, Martin KL, eds. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa: Humana Press; 2003. p. 199-206.
13. Parfitt AM, Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002;1:5-7.
14. Escolar JD, eds. *Principios de morfometría. Introducción a la cuantificación de la forma de muestras biológicas*. Zaragoza: Prensa Universitarias de Zaragoza; 1997.
15. Wiskott HWA, Belser UC. Lack of integration of smooth titanium surfaces: a working hypothesis based on strains generated in the surrounding bone. *Clin Oral Impl Res* 1999;10:429-44.
16. Martin RB. Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone* 2000;1: 1-6
17. Raghobear GM, Liem RSB, Vissink A. Vertical distraction of the severely resorbed edentulous mandible. A clinical, histological and electron microscopic study of 10 treated cases. *Clin Oral Impl Res* 2002;13:558-65.
18. Cano J. Distracción alveolar histogénica mediante un prototipo de distractor alveolar: estudio histomorfométrico en mandíbula de perro beagle. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid; 2004.
19. Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Curr Op Orthop* 2000;11:403-12.
20. Roberts WE, Garetto LP, Brezniak N. Fisiología y metabolismo óseo. En: Misch C, eds. *Implantología contemporánea*. Madrid: Mosby; 1995. p. 324-50.
21. Pallensen L, Schou S, Aaboe M, Hjorting-Hansen E, Nattstedt A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2002;17:498-506.
22. Serrano S. (1998). Estructura y función del hueso normal. <http://www.conganat.org/iicongress/conf/018/index.Htm>.
23. Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2003;18:341-8.
24. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Füst G, Benhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs 2003;18:15-22.
25. Hallman M, Senneryby L, Lundgren S. A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2002;17:635-43.
26. Zaffe D, Bertoldi C, Palumbo C, Consolo U. Morphofunctional and clinical study on mandibular alveolar distraction osteogenesis. *Clin Oral Impl Res* 2002;13:550-7.
27. Röser K, Johansson CB, Donath K, Albrektsson T. A new approach to demonstrate cellular activity in bone formation adjacent to implants. *J Biomed Mater Res* 2000;51:280-91.
28. McMillan PJ, Riggs ML, Bogle GC, Crigger M. Variables that influence the relationship between osseointegration and bone adjacent to an implant. *Int J Oral Maxillofac Imp*.2000;15:654-61.
29. Carr AB, Gerard DA, Larsen PE. Histomorphometric analysis of implant anchorage for 3 types of dental implants following 6 months of healing in baboons jaws. *Int J Oral Maxillofac Imp* 2000;15:785-91.
30. Chappard D, Aguado E, Hur G, Grizon F, Basle MF. The early remodelling phases around titanium implants: A histomorphometric assessment of bone quality in a 3 and 6 month study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Imp* 1999; 14:189-96.
31. Block MS, Gardiner D, Almerico B, Neal C. Loaded Hydroxylapatite-coated implants and uncoated titanium-threathed implants in distracted dog alveolar ridges. *Oral Surg Oral med Oral Pathol* 2000;6:676-85.
32. Klug CN, Millesi-Schobel GA, Millesi M, Watzinger F, Ewers R. Preprosthetic vertical distraction osteogenesis of the mandible using and L-shaped osteotomy and titanium membranes for guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 2001;59:1302-8.
33. Nosaka Y, Kitano S, Wada K, Komori T. Endosseous implants in horizontal alveolar ridge distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Imp* 2002;17: 846-53.
34. Oda T, Sawaki Y, Ueda M. Experimental alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis using a simple device that permits secondary implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:95-102.