



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Utilización de polímeros de Ácido poliláctico (PLA) como tratamiento en defectos óseos mandibulares en un modelo experimental con ratas”

Tesis

Que para obtener el título de Cirujano Dentista

Presenta

MARTÍNEZ MÉNDEZ FRANCISCO JAVIER

Directora de tesis

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Jurado:

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Dr. José Francisco Gómez Clavel

Dr. Alejandro García Muñoz

Biol. Marco Vladimir Granadas Hernández



Investigación realizada gracias por los proyectos: PAPIIT de la UNAM IA201814

Y el Proyecto CONACYT CB2014-1 235984

Los reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

I.-ABREVIATURAS.	4
II.-RESUMEN	5
III.-INTRODUCCIÓN	7
III.I TEJIDO ÓSEO.	9
III.I.I. Matriz ósea.	9
III.I.II Células del hueso.	11
III.I.III Morfología ósea.	13
III.I. IV. Osificación.	16
III.I.V. Remodelación ósea.	16
III.II. INGENIERÍA DE TEJIDOS.	18
III.II. I. Biomateriales.	19
III.II. II. Polímeros.	23
III.II. III. PLA.	25
IV. –ANTECEDENTES	27
V.- JUSTIFICACIÓN	32
VI.- OBJETIVOS	34
VI.I. OBJETIVO GENERAL	34
VI.II. OBJETIVOS PARTICULARES:	34
VII.- HIPÓTESIS	34
VII. I. HIPÓTESIS:	34
VIII.- MATERIAL Y MÉTODOS	35
VIII.I. PRUEBA DE BIOCOMPATIBILIDAD <i>IN VITRO</i>.	35
VIII.I.I. Ensayo de MTT.	35
VIII.I.II. Microscopía electrónica de barrido.	36
VIII.II. PRUEBA DE BIOCOMPATIBILIDAD <i>IN VIVO</i>.	37
VIII.II.I. Grupos de estudio.	37
VIII.I.II Defecto crítico mandibular (Técnica quirúrgica).	39
VIII.I.III Toma de la muestra y análisis radiográfico.	42
VII.IV. Procesamiento histológico de la muestra.	44
IX.- RESULTADOS	47
IX.I.- RESULTADOS <i>IN VITRO</i>.	47
IX.I.I. Resultados del ensayo de MTT.	47
IX.I.II. Resultados del MEB.	48

IX.II.-RESULTADOS MACROSCÓPICOS.	49
IX.II.I. Resultados macroscópicos del grupo sham.	49
IX.I. II. Resultados macroscópicos del grupo Experimental.	53
IX.II- RESULTADOS RADIOGRÁFICOS.	57
IX.II.I. Resultados radiográficos del grupo sham.	57
IX.II.II. Resultados radiográficos del grupo Experimental.	58
IX.III- RESULTADOS HISTOLÓGICOS.	59
IX.III.I.-Resultados Histológicos del grupo sham	59
IX.III.II.-Resultados Histológicos del grupo PLA.	63
X.-DISCUSIÓN.	67
XI.-CONCLUSIONES	71
TRABAJOS CITADOS	72

I.-Abreviaturas.

IT = Ingeniería de Tejidos (Tissue engineering)

IGF = Factor de crecimiento insulínico (Insulin-like growth factor)

MGP = Proteína Gla de la Matriz (Matrix Gla-protein)

TNF- α = Factor de necrosis tumoral α (Tumor necrosis factor α)

TGF- β = Factor de crecimiento tranformante β (Transforming growth factor β)

PDGF = Factores de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet derived growth factor)

BMP2= Proteína morfogénica ósea 2 (Bone Morphogenetic Protein 2)

FGF = Factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor)

PLA = Ácido poliláctico (Polylactic acid)

PTH = Hormona paratiroidea (Parathyroid hormone)

PGA= Ácido fosfoglicérico (Glycolic acid)

PEG= polietilenglicol (Polyglycol ethylene)

TCE= Traumatismo Craneoencefálico (Cranioencephalic Trauma)

MEB= Microscopia electrónica de barrido


II.-Resumen

Introducción: Una alternativa para los tratamientos para defectos óseos es la Ingeniería de Tejidos (IT), que busca crear nuevos tejidos a través de la selección y manipulación de células, andamios y estímulos biológicos. La IT de hueso ha implementado el uso de distintos biomateriales como andamios, con base en esto proponemos al PLA como un andamio en la IT, ya que sus características hacen de este una excelente opción en la regeneración ósea.

Objetivo principal: Comparar y valorar la regeneración ósea presente en los defectos óseos en un grupo de ratas tratadas con PLA.

Metodología: Todos los procedimientos en la presente tesis fueron realizados con apego a la norma mexicana, así como la aprobación y los estándares establecidos por la comisión de Bioética de la FES-I folio 1074 y la comisión de Bioseguridad de la FES-I folio 036. *In Vitro*, se utilizaron membranas de PLA en dos concentraciones (6 y 10%), a las cuales se les sembró células MSCat's 1×10^4 y se les realizó ensayos de MTT y MEB (Microscopia electrónica de barrido). En el estudio *in vivo* se emplearon 48 ratas Wistar, machos de 250g \pm 50g dispuestas en grupos: A= hemimandíbulas intactas izquierdas del grupo B. Grupo B (SHAM)n=6 y Grupo C (experimental)n=6. A los tiempos de estudio: 7, 14, 21 y 30 días. El. A los grupo B) y C) se le realizó un defecto en el cuerpo de la mandíbula derecha con unas dimensiones de 4x2x1mm, y al grupo B no se aplicó relleno y al C) se le colocó un andamio de PLA al 10% rectangular con dimensiones de 3mm x 2mm. Posterior a la cirugía, se sacrificaron los especímenes y se obtuvieron las muestras, las cuales se procesaron y evaluaron clínica, radiológica e histológicamente.

Resultados: En los resultados *in vitro* el PLA al 10% mostro una mayor cito-compatibilidad con las células sembradas MSCat's (Células troncales mesénquimas de tejido adiposo), ya que mostro un aumento de la viabilidad células a las pruebas de MTT y por medio de MEB. En los resultados *in vivo* en el grupo experimental aún se observó histológicamente la presencia del PLA10% a los 30 días.



Conclusiones: El grupo tratado con andamios de PLA 10% mostro características de osteoconducción, ya que sustituyó a la matriz extracelular, promoviendo la adhesión celular, la diferenciación y deposición de matriz ósea. Podemos decir que los andamios de PLA10% pueden ser una herramienta útil en la IT.

III.-Introducción

En la actualidad, los defectos óseos representan uno de los casos de mayor impacto en la salud debido a la frecuencia con que estos se presentan, estos pueden ocurrir a causa de traumatismos, fracturas, enfermedades congénitas o degenerativas (Peral, 2008) (Tollema, 2016). En la Odontología y en la Cirugía Maxilofacial son uno de los problemas más importantes al que nos enfrentamos, debido a la cotidianidad con que se presentan y a las limitadas opciones que existen para su tratamiento; ya que este depende en gran medida de la localización de la zona a tratar y de la naturaleza del defecto, llegando a causar distintas alteraciones funcionales y estéticas (Joong, 2013).

Uno de los objetivos del tratamiento de un defecto óseo es restaurar la forma y función ideal de la estructura afectada, para lograrlo actualmente, se han desarrollado técnicas quirúrgicas específicas como: autoinjertos (trasplante de tejido del mismo individuo), aloinjertos (hueso donante de individuos de la misma especie), xenoinjertos (de un donante de otra especie) e injertos aloplásticos (sustitutos no óseos) que son matrices desmineralizadas y una amplia gama de biomateriales sintéticos como: metales, cerámicas, polímeros, materiales compuestos, etc.); de los anteriores, el autoinjerto es el más utilizado debido a las características que presenta y que lo han llevado a obtener las mejores tasas de éxito dentro del área de injertos óseos (Andrades, 2011) (Li, 2015).

En general, los injertos aloplásticos representan una buena opción debido a las ventajas que ostentan en comparación con las demás terapias utilizadas, ya que dependiendo del material con que se fabrican cuentan con características específicas, que le confieren propiedades mecánicas y biológicas que favorecen la regeneración, se pueden encontrar en cantidades ilimitadas y el costo del tratamiento se reduce en relación al material utilizado (Abarca, 2010).

En la siguiente tabla se describen las ventajas y desventajas de los métodos más utilizados para tratar los defectos óseos (Li, 2015) (Marcelly, 2012) (Bello, 2012).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las principales técnicas para tratar defectos óseos.

	Ventajas	Desventajas
Autoinjertos	Carece de inmunogenicidad y poseen células osteoprogenitoras que llegan directamente al sitio y atraen células mesenquimales e inducen su diferenciación a células osteoprogenitoras.	Poca disponibilidad de sitios donantes, cantidad limitada de tejido que puede ser tomado y morbilidad de la zona donadora.
Aloinjertos	Elimina la morbilidad del procedimiento para obtención del material del trasplante y la cantidad de material ya no es una limitante.	Porcentaje de osteointegración es menor, debido a la ausencia de células osteoprogenitoras. Puede causar reacción inmune y transmitir patógenos del donante al huésped.
Xenoinjerto	Elimina la morbilidad del procedimiento para obtención del material del trasplante y la cantidad de material ya no es una limitante.	Baja revascularización y alto porcentaje de reabsorción lo que conduce a una pobre neoformación ósea, además de la posibilidad de transmisión de enfermedades y rechazo inmunológico.
Aloplásticos	El material se puede fabricar ajustándose a las características necesarias del sitio, tanto mecánicas como biológicas, dependiendo el material los precios disminuyen	Están sujetos a la fatiga, fractura, toxicidad y desgaste, no se remodelan adecuadamente con el tiempo y pueden tener problemas de integración con los tejidos adyacentes.

Una alternativa o terapia coadyuvante a los tratamientos convencionales es la Ingeniería de Tejidos (IT) que busca crear e inducir la formación de un tejido específico en una ubicación detallada a través de la selección y manipulación de células, andamios y estímulos biológicos (Muschler, 2002). Este tipo de terapias han sido estudiadas para la regeneración de diferentes tejidos como son: el tejido cutáneo, hepático, cardiovascular y más recientemente, el cartilaginoso y el tejido óseo (Li, 2015).

Tomando esto en cuenta, la utilización de biomateriales para favorecer la regeneración ósea surge como una posibilidad prometedora para mejorar los procedimientos actuales en la clínica odontológica.

III.I Tejido óseo.

El hueso es un tejido conectivo especializado, que se encuentra compuesto por células y una matriz extracelular mineralizada que le otorga rigidez y fuerza, se encuentra vascularizado e innervado; y es el tercer tejido más duro del organismo (Ross, 2008), sirve también como depósito de calcio y fosfato, donde ambos pueden ser movilizados de la matriz ósea y captados por la sangre según sea necesario para mantener las concentraciones adecuadas en el organismo (Gartner, 2010), sirve de sostén del organismo y protege a los órganos vitales como el cerebro y médula espinal, presenta puntos de inserción con los músculos esqueléticos lo que hace posible el movimiento, asimismo, en la cavidad medular del hueso se encuentra la medula ósea, la cual lleva a cabo la hematopoyesis y se encuentra sometido a una continua remodelación (Stevens, 2007).

III.I.I. Matriz ósea.

Se compone por aproximadamente un 15% de agua, un 50 % de sales minerales (matriz inorgánica) y un 35% de matriz orgánica (Ross, 2008). La matriz orgánica también conocida como sustancia osteoide está compuesta principalmente por proteínas en la que destaca el colágeno tipo I que constituye entre el 80 y el 90 % de la misma, está también contiene otras proteínas no colágenas (macromolécula de proteoglicanos, glucoproteínas adhesivas, proteínas dependientes de la vitamina K osteoespecíficas, factores de crecimiento y citocinas) que forman la sustancia fundamental del tejido óseo y son indispensables para el desarrollo, crecimiento, remodelado y la reparación de hueso cuya función se explica en la tabla #2 (Ross, 2008) (Fawcett, 2011).

La sustancia inorgánica se compone en un 65% de calcio y fosfato en su mayoría en forma de cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que se distribuyen en los espacios intersticiales que separan las fibras de colágeno tipo I, estos cristales atraen agua que crea una cubierta de hidratación que facilita el intercambio iónico con el líquido extracelular (Fawcett, 2011).

Tabla 2. Proteínas de la matriz ósea y su función (Ross, 2008)

	Tipos		Función
Colágeno	Tipo I, III, V, XI, XIII		Soporte
Macromolécula proteoglicanos	de	<ul style="list-style-type: none"> - Hialuronato - Condroitín sulfato - Queratán sulfato - Decorina 	Contribuyen a que el tejido óseo ofrezca resistencia a la compresión, fijan los factores de crecimiento e inhiben la mineralización
Glucoproteínas adhesivas		<ul style="list-style-type: none"> - Osteonectina - Osteopontina - Sialoproteínas I y II 	Sirve como adhesivo entre el colágeno y los cristales de hidroxiapatita. Media la adhesión de las células a la matriz ósea. Inician la formación de fosfato de calcio durante el proceso de mineralización.
Proteínas dependientes de la vitamina K osteo-específicas		<ul style="list-style-type: none"> - Osteocalcina - Proteína S - Proteína Gla Matricial (MGP). 	Capturan el calcio desde la circulación y atrae y estimula a los osteoclastos en el remodelado óseo.
Factores de crecimiento y citosinas.	-	<ul style="list-style-type: none"> - Factor de crecimiento insulínico (IGF) - Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) - Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) - Factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF) - Proteínas morfogenéticas ósea (BMPs) 	Actúan en el desarrollo, crecimiento, remodelado y reparación del hueso

La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso ya que, las fibras de colágeno proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión, mientras que las sales minerales confieren dureza.

III.I.II Células del hueso

Aparte de la matriz ósea, el hueso se compone de cuatro clases de células, tres de ellas (células osteoprogenitoras, osteoblastos y osteocitos) pertenecen al linaje mesodérmico, mientras que la cuarta (osteoclastos) proviene de precursores monocíticos (Stevens, 2007) (Gartner, 2010).

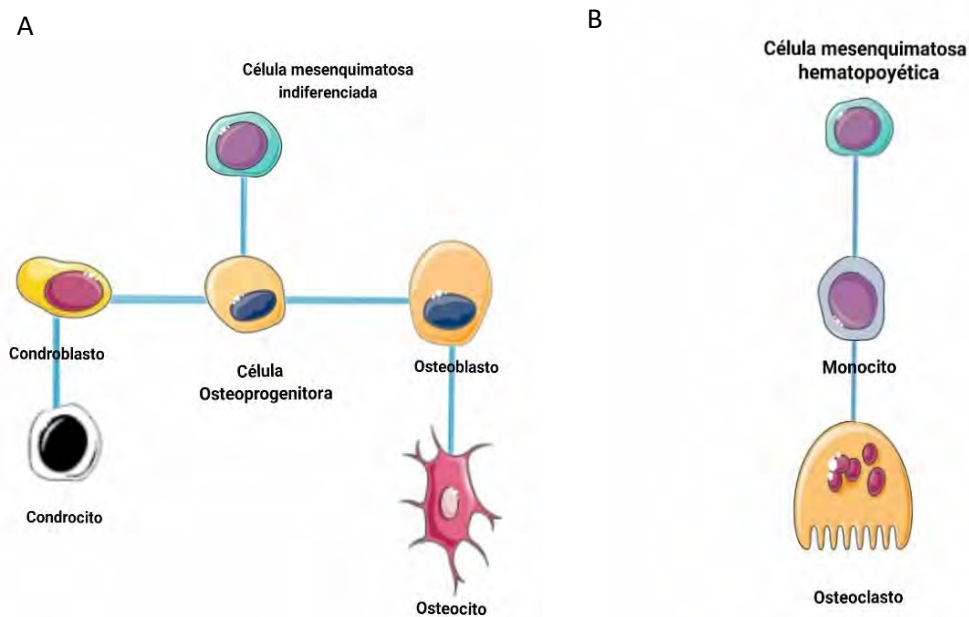


Figura 1 Esquematización del linaje de las células del hueso, donde A ilustra el origen de los osteocitos derivados de células mesenquimales indiferenciadas, mientras B muestra el origen monocítico de los osteoclastos (Gartner, 2010).

- Células osteoprogenitoras: son células derivadas de las células mesenquimales que dan origen a los osteoblastos, se encuentran en el periostio en la superficie externa del hueso, en el endostio que recubre las diáfisis y revisten los canales de Havers y las cavidades medulares, son de núcleo alargado y su citoplasma es acidófilo (Stevens, 2007). Estas células expanden su población y derivan a osteoblastos cuando la tensión de oxígeno es elevada o a células condrogénicas cuando es baja (Fawcett, 2011) (Arboleja, 2013).

- Osteoblastos: son células que secretan matriz extracelular del tejido óseo, su tamaño promedio oscila entre 20 y 30 μm de diámetro, presentan un aspecto prismático y piriforme con uniones entre ellas de forma discontinua adoptando una posición pseudo-epitelial, muestra un aparato de Golgi muy desarrollado, su citoplasma muestra una marcada basofilia que es más intensa en las células en actividad (Moreno, 2015). Sintetizan colágeno de tipo I, proteoglicanos y glucoproteínas, además tiene receptores en la superficie celular para hormonas, vitaminas y citoquinas que influyen en su actividad (Stevens, 2007).
- Osteocitos: son células que se derivan de los osteoblastos, no presentan capacidad proliferativa (Ross, 2008), se encuentran en las lagunas del hueso y sus delgadas proyecciones osteocíticas se extienden a través de los canalículos y entran en contacto con osteocitos adyacentes formando las uniones gap con el fin de facilitar la comunicación de las células que integran el tejido óseo, poseen una forma estrellada y son las células más abundantes el tejido óseo (10 veces más que los osteoblastos) (Stevens, 2007).
- Osteoclastos: son células originarias del sistema fagocítico mononuclear, de gran tamaño con un diámetro promedio de 150 μm , son multinucleadas (≤ 50 núcleos), encargadas de la reabsorción ósea, presentes en superficies óseas en las que el hueso se está eliminando o remodelando (reorganizando) o donde el hueso ha sido dañado, muestran polaridad, sus núcleos están agrupados en la superficie libre de contorno liso, el otro polo que se encuentra próximo al hueso tiene un aspecto estriado que forma profundos pliegues (Borde fruncido), posee múltiples aparatos de Golgi y parejas de centriolos, cuenta con muchas mitocondrias, retículos endoplásmicos rugoso y lisosomas en citoplasma cercano al borde fruncido (Ross, 2008) (Gartner, 2010) (Arbolea, 2013).

III.I.III Morfología ósea.

El tejido óseo es el componente estructural de los huesos y estos a su vez son los órganos del sistema esquelético. El hueso está compuesto por varios tejidos conectivos aparte del tejido óseo como pueden ser el tejido hematopoyético, adiposo, vasos sanguíneos, nervios y cartílago hialino (Gartner, 2010).

La superficie externa del hueso está recubierta por tejido conjuntivo blando denominada periostio, con excepción en las regiones donde se articulan con otros huesos. El periostio consta de dos capas, una capa fibrosa externa formada por el tejido conectivo colágeno denso e irregular y una segunda capa denominada capa celular interna con capacidad osteogénica, que alberga células osteoprogenitoras, osteoblastos y, a veces, osteoclastos. Las fibras de colágeno del periostio son paralelas a la superficie del hueso y forman una capsula, en comparación con las fibras de los ligamentos y tendones que se unen al hueso donde las fibras se extienden directamente al interior del tejido óseo formando un ángulo y se continúan con las fibras de colágeno de la matriz extra celular ósea a las cuales se les denomina fibras de Sharpey (Ross, 2008).

La cavidad medular o medula es un espacio interior de la diáfisis que contiene la medula ósea amarilla en los huesos adultos y se encuentra formada principalmente por células adiposas y algunas células sanguíneas distribuidas, estas cavidades medulares están tapizadas de endostio, una delgada capa celular formada por células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos y elementos aislados del tejido conjuntivo (Stevens, 2007).

Según su densidad los huesos se pueden clasificar en: hueso denso (hueso compacto) y hueso esponjiforme (hueso esponjoso). El hueso compacto es el principal responsable de la integridad mecánica, debido a que compone aproximadamente un 80 % del hueso; el hueso esponjoso es el responsable fundamental de las demandas metabólicas y constituye aproximadamente el 20%. Se distinguen uno de otro por la forma en que está organizada su matriz y sus células, ya que el hueso compacto adulto cuenta con una estructura organizada en

anillos concéntricos en comparación con el hueso esponjoso que presenta una distribución irregular de trabéculas (delgadas espículas de tejido óseo anastomosadas) (Ross, 2008).

Por su morfología externa los huesos se clasifican como:

- Huesos largos: Tienen una longitud mayor y están formados por un eje delgado, una diáfisis y dos cabezas (epífisis), por ejemplo, la tibia y los metacarpianos.
- Huesos cortos: de anchura similar a su longitud, por ejemplo, los huesos del carpo.
- Huesos planos: Compuestos por dos placas planas de hueso compacto entre las que se encuentra una capa de hueso esponjoso, son delgados y anchos, por ejemplo, huesos de la calota craneana.
- Huesos irregulares: sin ninguna morfología definida.

Por su morfología microscópica se pueden clasificar a los huesos como:

- Hueso primario (hueso inmaduro o entrelazado): es el primero que se forma a lo largo del desarrollo y durante el proceso de reparación ósea, se puede distinguir del hueso maduro por la abundancia del componente celular y un menor grado de calcificación, así como una distribución aleatoria de fibras de colágeno como se observa en la Figura 3, se tiñe mejor con hematoxilina mientras que la matriz del hueso maduro se tiñe más intensamente con eosina. Es sustituido por hueso secundario con excepción de los alveolos dentales y las inserciones tendinosas.
- Hueso secundario (hueso maduro o laminar): se caracteriza por ser un tejido muy organizado en láminas óseas concéntricas llamadas osteonas o sistemas de Havers, con un grosor aproximado de 3 a 7 μm , presenta un mayor grado de calcificación y la disposición ordenada de las fibras de colágeno que le otorga una dureza mayor que el hueso primario, se puede observar en la Figura 3 (Stevens, 2007).

Las osteonas consisten en laminillas concéntricas de matriz ósea alrededor de un conducto central denominado conducto de Havers que contiene vasos y nervios, los conductos haversianos están conectados entre sí por otros canales llamados conducto de Volkman.

Existen pequeños espacios o lagunillas entre las laminillas donde se depositan las células óseas maduras (osteocitos). Otra estructura del osteoma son los canaliculos se disponen siguiendo un patrón radial con respecto al conducto y sirven para el intercambio de sustancias entre los osteocitos y los vasos sanguíneos. Entre una osteona y otra existen laminillas antiguas que reciben el nombre de laminillas intersticiales, esta estructura puede observarse en la Figura 2.

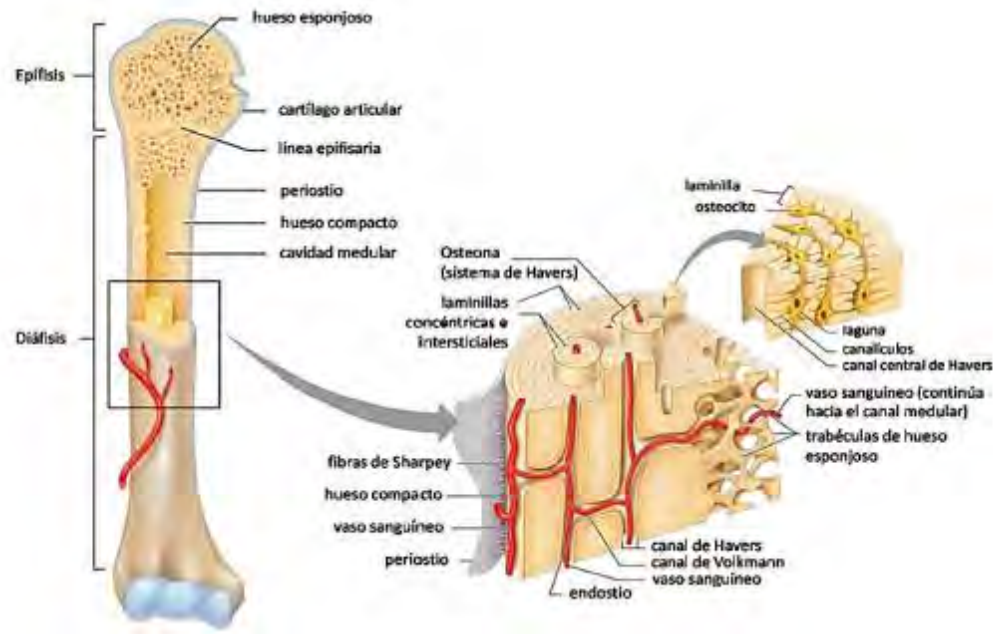


Figura 2. Morfología ósea de un hueso largo con un aumento del sistema de Havers en el cual aparece la estructura del hueso cortical compacto, así como en hueso esponjoso y sus componentes. (Imagen tomada de Maried, Hoehn 2007).

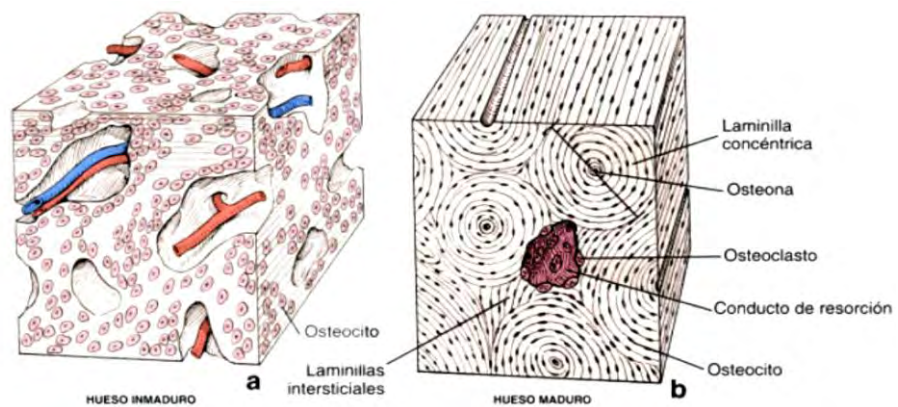


Figura 3. Esquema del hueso inmaduro en comparación con hueso maduro (imagen tomada de Ross 2007).

III.I. IV. Osificación.

El hueso inicia su desarrollo a lo largo de la etapa embrionaria mediante un proceso denominado osificación. Existen dos tipos de osificaciones, la formación intramembranosa y la formación endocondral, a pesar que ambos procesos difieren notablemente, histológicamente sus productos finales son idénticos (Gartner, 2010). Los huesos de las extremidades y los del esqueleto axial que soportan peso se desarrollan por osificación endocondral, mientras que los huesos planos del cráneo, la cara, la mandíbula y la clavícula se forman por osificación intramembranosa (Ross, 2008).

La osificación intramembranosa se produce en un entorno muy vascularizado y por la condensación de células mesénquimales en áreas específicas, induciendo la formación de estas en osteoblastos, que posteriormente formaran la matriz osteoide. En los seres humanos, el primer indicio de osificación intramembranosa aparece alrededor de la octava semana de gestación. La osificación endocondral comienza con la acumulación y proliferación de células mesénquimales en un sitio donde se desarrolla el hueso, bajo influencia de factores de crecimiento fibroblástico (FGF) y diferentes BMPs, posteriormente, las células mesénquimales se diferencian en condroblastos, y estos a su vez producen la matriz cartilaginosa que subsecuentemente se mineralizara formando tejido óseo (Gartner, 2010).

De cualquiera de las dos vías de formación de hueso, en un inicio se estructura de hueso primario que posteriormente se reabsorbe y sustituye por hueso secundario, considerado un tejido sometido continuamente a reabsorción y remodelación como respuesta a las fuerzas ambientales a las que se enfrenta a lo largo de la vida (Fawcett, 2011).

III.I.V. Remodelación ósea.

Es el proceso mediante el cual el hueso se recambia, y se lleva a cabo por la actividad de las células del hueso en la superficie. El hueso adulto está sometido a un continuo remodelado y a su vez, los sistemas de Havers son sustituidos continuamente en reacción a las constantes

fuerzas ambientales a las que están sometidos, esto consiste en la formación de tejido óseo nuevo con reabsorción parcial del tejido ya formado, de esta manera los huesos mantienen su forma al tiempo que crecen (Ross, 2008).

En el hueso compacto, las células responden a distintos factores sistémicos como los niveles de calcitonina y PTH, mientras que en el hueso esponjoso los factores sintetizados por la médula ósea, como el factor estimulador de colonias 1, TNF- α , la interleucina 1 y el TGF- β son los que interactúan con las células (Ross, 2008).

Al sustituirse, los sistemas de Havers provoca la muerte de los osteocitos y los osteoclastos se ocupan de la reabsorción de una fracción de los antiguos sistemas, lo que da lugar a la aparición de cavidades de resorción; estas cavidades, a medida que continúa la actividad de los osteoclastos son invadidas por vasos sanguíneos, la síntesis de laminillas continuas que rodean los vasos crea un nuevo sistema de Havers lo que se supone en la formación de hueso nuevo (Figura4) (Gartner, 2010) (Alfaro, 2011) (Fawcett, 2011).

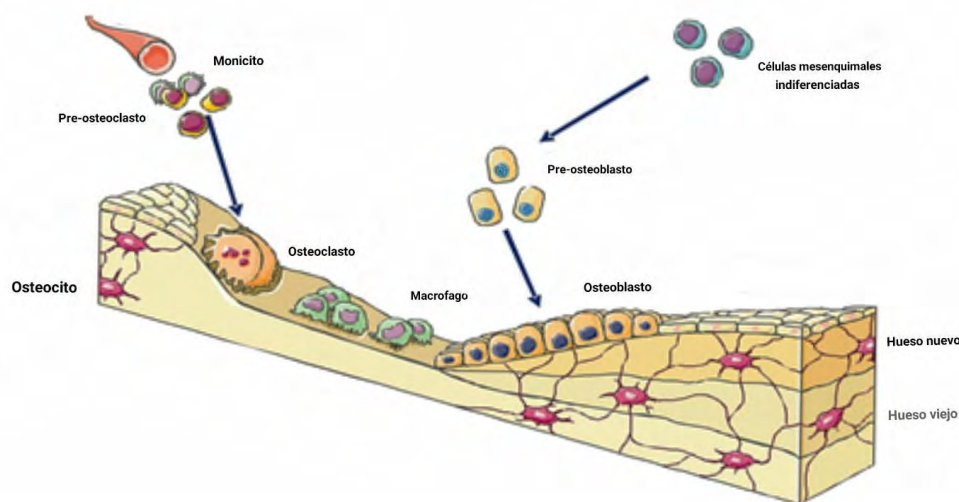


Figura 4. Esquema que representa el proceso de remodelado óseo (Rivasplata, 2017).

En el esqueleto de un adulto normal existen alrededor de unos 2 millones de sitios de remodelado que trabajan a una velocidad de 25 m por día y reemplazan un volumen óseo en cada sitio de $0,025 \text{ mm}^3$. Bajo condiciones normales el 75% de las superficies del hueso trabecular y alrededor del 95% del cortical se encuentran en reposo, las osteonas reabsorbidas constituyen el sistema laminar intersticial o balance óseo, alcanzando aproximadamente un valor igual a cero hasta los 40 años, y de cerca de -3% a después de esta edad. La velocidad de renovación ósea, o el volumen de hueso renovado en la unidad de tiempo, se conoce con el término de recambio óseo (Arboleya, 2013).

III.II. Ingeniería de tejidos.

Para lograr sus objetivos la IT se apoya de varias ramas de la Medicina como son: la Biología, la Química Molecular y la Ingeniería de Materiales, que le ofrecen las herramientas necesarias para consolidar terapias que le ayuden a alcanzar su objetivo, basándose en tres elementos básicos como son una matriz adecuada, células que fomentan la regeneración de la lesión e interacciones moleculares (Tollemar, 2016) (Hing, 2004), esta triada se observa en la Figura 5.

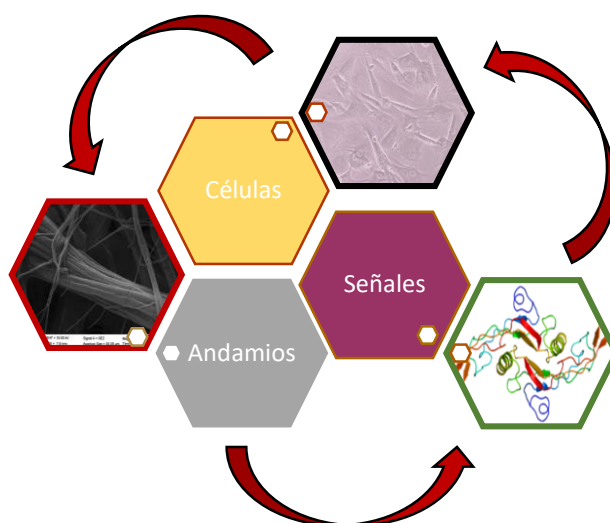


Figura 5. Esquema de los elementos básicos con los que trabaja la ingeniería de tejidos (células, andamios y señales).

Actualmente existen diferentes estudios que combinan estos elementos y se basan en los tejidos a reparar y la zona específica en la que se localiza la lesión para la implementación de constructos ideales para el tejido o zona dañada, llegando a la conclusión de que existe gran número de variables al momento de establecer un modelo experimental, sin embargo, en el tema de la regeneración ósea ha habido extensas investigaciones que revelan los componentes necesarios que favorecen y generan resultados óptimos en la regeneración ósea. Estos son cuatro elementos que se conceptualizan con el término de “concepto diamante” y son: una matriz extracelular osteoconductora, células con potencial osteogénico, moléculas de señalización para la osteoinducción, vascularización, así como estabilidad mecánica (Giannoudis, 2007).

Regeneración ósea



Figura 6. Esquema del “concepto diamante” en el que se observa los componentes necesarios con los cuales se apoya la IT que favorecen y generan resultados óptimos en la regeneración ósea (Tollema, 2016).

III.II. I. Biomateriales.

Se define así a los materiales diseñados para actuar e interactuar con sistemas biológicos, que tienen como finalidad: evaluar, tratar, aumentar o remplazar algún tejido órgano o función del cuerpo. Los biomateriales se utilizan en la IT como matrices tridimensionales que proporcionan el apoyo que requieren las células para su proliferación y mantenimiento de sus funciones, así como las señales biológicas necesarias para su conservación de la expresión genética específica (Savioli, 2012).

III.II.I.I Características ideales de un biomaterial.

Dependiendo de la naturaleza del biomaterial este adquiere propiedades estructurales y biológicas que le confieren características específicas en su aplicación *in vivo*. Los biomateriales se deben ajustar a los requerimientos biológicos necesarios del huésped para conseguir la regeneración deseada, por lo que el hueso, es necesario el biomaterial sea biodegradable y permita a las células generar su propia matriz extracelular y, transcurrido un tiempo, está reemplace al material por un nuevo tejido (Jie Yuan, 2012).

En general, los requerimientos mínimos para la implantación de un biomaterial son (Gyle, 2017):

- Biocompatibilidad: Definida en 1967 por la Sociedad Europea de Biomateriales como la habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta al huésped en una aplicación específica. La NOM ISO 10993 estipula los ensayos biológicos que se deben aplicar a un biomaterial para ser considerado biocompatible, esto se observa esquematizado en la Tabla - 3.
- Esterilizable: El material debe ser capaz de ser sometido y soportar la esterilización por diferentes medios como: calor seco, calor húmedo, rayos gamma, gas y no presentar interacciones o afectarse ni deformarse por estos medios.

- **Funcionabilidad:** debe de tener la capacidad de adaptarse y conseguir una forma adecuada para desempeñar una acción requerida.
- **Manufacturabilidad:** El proceso mediante se fabrica el biomaterial de ser relativamente fácil, altamente reproducible, económico, ecológico y no debe alterar la función para la cual fue creado.

Tabla-3. Ensayos biológicos que se pueden aplicar a un biomaterial para que sea considerado biocompatible.

Citotoxicidad	ISO 10993-5	Reactividad intra-cutánea	ISO 10993-10
Sensibilización	ISO 10993-10	Genotoxicidad	ISO 10993-3
Irritación	ISO 10993-10	Efectos de la implantación en distintos tejidos	ISO 10993-6
Toxicidad sistémica	ISO 10993-11	Homocompatibilidad	ISO 10993-4

En la aplicación de biomateriales en la Ingeniería de tejido óseo, las especificaciones o propiedades son (Shady Farah, 2016) (Gyle, 2017) (Triplett, 2017):

- **Osteoinducción:** Se refiere a cualidad del biomaterial de reclutar e inducir a las células troncales indiferenciadas en células osteoprogenitoras.
- **Osteoconducción:** Es la cualidad del biomaterial de atraer a las células con potencial osteogénica migrar a su superficie y mantenerse ahí.
- **Biocompatibilidad:** Es la integración adecuada del biomaterial al tejido del huésped sin generar efectos tóxicos o causar respuesta inmune. También es la tolerancia del huésped al biomaterial.
- **Porosidad:** Debe contener una estructura y dimensiones de poro idóneas (entre 100 y 500 μm en hueso) que permita la difusión de nutrientes, gases y desechos metabólicos. Si los poros son demasiado pequeños, la migración celular es limitada,

esto a su vez puede limitar la difusión de los nutrientes y la eliminación de los residuos metabólicos generando una región necrótica dentro del constructo. Por el contrario, si los poros son demasiado grandes hay una disminución en el área superficial limitando la adhesión celular.

- ⦿ Propiedades de la superficie: Estas controlan y afectan la adhesión y proliferación celular. Las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material.
- ⦿ Propiedades mecánicas: el biomaterial debe de soportar las fuerzas a las que será sometido en el organismo para ejercer su función.
- ⦿ Biodegradabilidad. Debe contar con tasas de resorción que igualen a las de formación ósea, de tal manera que, para cuando la lesión esté totalmente regenerada, el biomaterial se haya degradado totalmente.

Los biomateriales se han clasificado de diversas maneras, cuando son clasificados de acuerdo con la respuesta que produce el huésped (Badami, 2006):

- ⦿ Biotolerados: Son encapsulados por una capa de tejido conjuntivo fibroso, algunos ejemplos pueden ser: el acero inoxidable y Cr.
- ⦿ Bioinertes: La superficie del material está cubierta por una capa de óxido estable y presenta contacto directo con el órgano a reparar.
- ⦿ Bioactivos: producen un enlace químico directo gracias a su capacidad para fijar proteínas inductoras en la superficie.

III.II. I. II. Clasificación de los biomateriales.

Los biomateriales se pueden clasificar según su origen como se observa en la tabla-4.

Tabla-4. Clasificación de biomateriales según su origen.

Materiales biológicos			
Tejidos Blandos:		Tejidos Duros:	
- Piel		- Hueso	
-Tendón		- Dentina	
-Pericardio			

Materiales sintéticos			
Polímeros:	Cerámicas:	Metales:	Materiales compuestos:
-PLA	-Implantes dentales	-Acero	-Composites
-PGA	-Hidroxiapatita	-Titanio	
	-Alúmina	-Aleaciones	
	-Fosfato tricálcico		

Las tres clases de biomateriales que muy frecuentemente se utilizan para la regeneración ósea son: biocerámicas, polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos son los más usados porque poseen propiedades químicas y mecánicas que no tienen los polímeros naturales, además, poseen menor riesgo de generar una respuesta inmune o transmitir patologías, y pueden ser producidos bajo condiciones específicas, controlando la presencia de impurezas en el material y mostrando características generales predecibles y reproducibles como el modulo elástico, la fuerza tención y la tasa de degradación (Rezwan K, 2006).

III.II. II. Polímeros.

Los polímeros son macromoléculas compuestas por una o varias unidades químicas (monómeros) que se repiten a lo largo de toda una cadena, su peso molecular determina de manera directa su tamaño, así como sus propiedades químicas y mecánicas (viscosidad, resistencia a la fluencia, resistencia a la abrasión, etc.) (Estrada, 2006).

Los polímeros se pueden clasificar en:

- ⦿ Homopolímero - Se le denomina así al polímero que está formado por el mismo monómero a lo largo de toda su cadena.
- ⦿ Copolímero - Se le denomina así al polímero que está formado por al menos 2 monómeros diferentes a lo largo de toda su cadena.

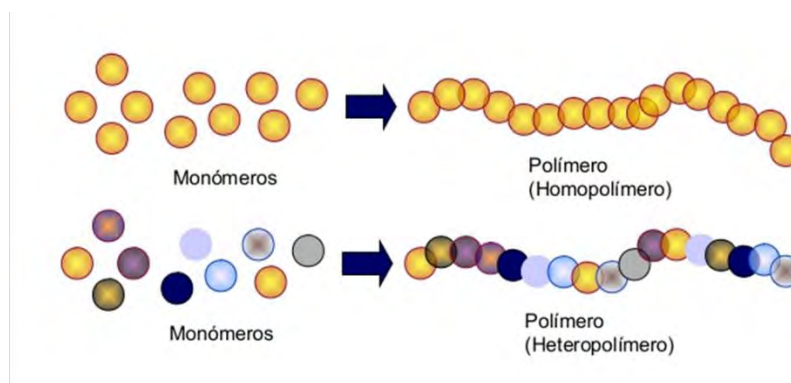


Figura 7. Esquema sobre clasificación de los polímeros según equivalencia de monómeros que los componen. (Andrae, 2017)

Las propiedades físicas de los polímeros incluyen: peso molecular, viscosidad, cristalinidad, temperaturas de fusión y transición vítrea. El peso molecular del polímero afecta sus propiedades mecánicas y la cinética de degradación, por ello es un factor crítico a evaluar y a su vez la viscosidad intrínseca, que se correlaciona con el peso molecular, siendo una medida de la resistencia al flujo del polímero y un indicador del tamaño promedio de las cadenas poliméricas (Vert M, 1992).

Dadas las características y propiedades de los polímeros biodegradables, las aplicaciones clínicas de estos materiales son variadas, entre las formas más tradicionales se encuentran suturas reabsorbibles, sistemas de liberación de medicamentos y sistemas de fijación ortopédica como: pasadores, barras y tornillos (Savioli, 2012).

Una de las aplicaciones más recientes de los polímeros está presente en la IT en donde pueden ser usados como biomateriales conteniendo proteínas que aporten las señales

estimuladoras que desencadenen los acontecimientos necesarios para la proliferación, diferenciación y migración celular del tejido óseo (Ostafinska, 2017).

Según la literatura, los polímeros degradables más utilizados como andamios para favorecer la regeneración ósea son: poliésteres derivados de láctida, glicolida, caprolactona; con el objetivo de sustituir la matriz extracelular, promoviendo la adhesión celular, la diferenciación, y la deposición de matriz ósea, para luego, desaparecer cuando son sustituidos gradualmente por el tejido regenerado (Savioli, 2012) (Vert M, 1992). La arquitectura y la porosidad de los polímeros degradables son fundamentales para promover la regeneración ósea exitosa (Rimondini, 2005).

III.II. III. PLA.

El ácido poli láctico (ácido 2-hidroxipropanoico) o PLA, es un polímero termoplástico del grupo poliéster derivado del ácido láctico que forma parte de los hidroxiácidos; su molécula contiene un átomo de carbono asimétrico y es el hidroxiácido más sencillo que existe, se puede encontrar bajo 2 enantiómeros o formas isoméricas: L, D, además de una forma meso y 2 racémicas L+ y D- (Savioli, 2012) Fig. #8. Fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria posteriormente, se encontró este mismo ácido en la sangre (Serna, 2003).

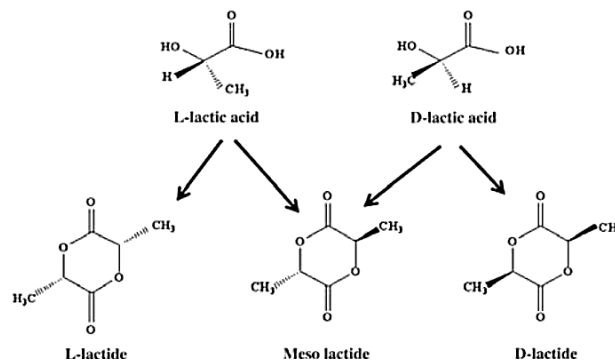


Figura 8. Formas químicas en las que se puede presentar el PLA

En 1970 los productos derivados del PLA fueron aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para el contacto directo con fluidos biológicos (Yao, 2017). Existen cuatro ventajas que lo hacen más atractivo en comparación con los demás polímeros, las cuales son: renovable, biocompatibilidad, procesabilidad, y el ahorro energético (Serna, 2003).

El PLA se deriva de recursos degradables como el maíz y el arroz, los productos resultantes de su degradación (H₂O y CO₂) no son tóxicos ni cancerígenos para el cuerpo humano, por lo tanto, es un material excelente para aplicaciones biomédicas incluyendo suturas, clips, material de fijación y en sistemas de administración de fármacos (Lopes, 2014).

La primera membrana reabsorbible aprobada por la FDA, fue la llamada “Guidor”, una barrera de matriz bioabsorbible compuesta por ácido poli láctico, el cual fue reblandecido con ácido cítrico para mejor maleabilidad y manejo clínico (Decco, 2009).

A diferencia del isómero D(-), la configuración L(+) del PLA es metabolizada por el organismo humano ya que, el ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo (Serna, 2003). El PLA se degrada inicialmente por hidrólisis y su degradación no requiere ningún uso de enzimas o catalizadores externos, por lo que no se necesita una extracción quirúrgica del implante (Savioli, 2012).

Dentro del organismo el PLA es degradado por la presencia de enzimas, lo que conlleva la liberación de sus respectivos monómeros, estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular donde continúa su degradación. Esta forma es semicristalina, con un 37% de cristalinidad y presenta una tasa de degradación lenta, además, tiene buena fuerza tensil y un alto módulo de Young, convirtiéndola en un candidato para aplicaciones en las que se requiera soporte de cargas biomecánicas como fijaciones ortopédicas (Savioli, 2012). Por otra parte, las formas D (-) y -D, L(-) son amorfas y presentan una tasa de degradación más rápida y menor fuerza tensil en comparación con el PLA-L(+) (Riaño, 2012).

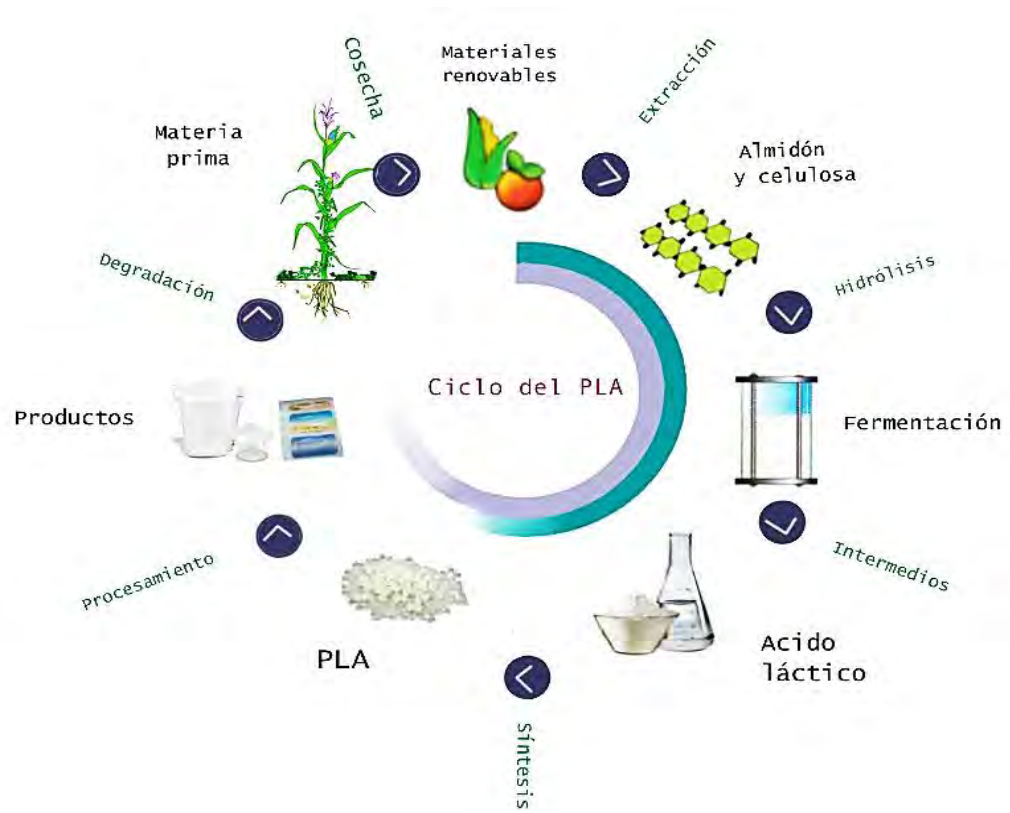


Figura 9. Esquemización del ciclo natural del PLA (Xiao Li, 2011).

IV. –Antecedentes

Los continuos estudios en IT han llevado a grandes avances en el área de regeneración ósea, sin embargo, aún no se logra un procedimiento óptimo a seguir en el tratamiento de grandes defectos. Se ha experimentado con biomateriales en combinación con biomoléculas, y han logrado conseguir resultados alentadores al tratar de favorecer la regeneración ósea.

En su amplia revisión Tajbakhsh S. y colaboradores (Tajbakhsh, 2017) concluyen que los andamios y biomateriales compuestos con fibras de revestimiento de PLA mejoran con mucho las propiedades de estos biomateriales compuestos para de uso en aplicaciones biomédicas.

Gruber R. y colaboradores en el 2009, realizaron un estudio en el que implantaron biomateriales cilíndricos de PLA+rhBMP-2, en los músculos de los glúteos de ratas Wistar. Los implantes fueron evaluados a 6, 13 y 26 semanas y encontraron que en el grupo con solo PLA este no tuvo propiedades osteoinductoras pero estaban rodeados de tejido altamente vascular y a las 6 semanas que mostraron una mayor actividad de resorción a través de numerosas células gigantes multinucleadas y en el grupo con PLA+rhBMP-2 encontraron la inducción de hueso ectópico en una liberación de > 100 ng/72 h de BMP2 (Gruber, 2009).

Lou T. y colaboradores en el 2013 probaron un andamio nano-fibroso de poli (L-láctico ácido) PLA reforzado con micro-fibras quitosano (MCTSF) que demostró tener una buena degradación in vitro, aumento en la capacidad de adsorción de proteínas y buena cito-compatibilidad, por lo que ellos lo sugieren como posible material candidato en la IT (Lou, 2013).

Sahar DE. y colaboradores en 2012, realizaron un estudio donde probaron la capacidad de promover la regeneración ósea de andamio hechos de Poli (D, L-lactida) (PLA) sembrados con células ADSC (células troncales de tejido adiposo) diferenciadas en el constructo a la línea osteogénica y endotelial. Realizaron Los defectos críticos en la bóveda craneal de ratas que con 4 andamios diferentes: (1) PLA andamio solo (control, n = 9), (2) PLA andamio + ASC-Endo (Endo, n = 8), (3) de andamio PLA + indiferenciadas ASC (ASC, n = 8), y (4) del andamio PLA + ASC-Osteo (Osteo, n = 9). El tiempo de estudio fue de 8 semanas. En sus resultados reportaron que no hubo diferencias estadísticas entre el control de PLA y el grupo PLA+ASC-Endo ya que la

prevascularización del andamio PLA con células ASC-Endo no aumento la formación de hueso por sí mismo, pero puede ser utilizado como una fuente de células para mejorar la vascularización y mejorar potencialmente la función osteoblástica existente (Sahar, 2012).

Xu Wen-Huan, et al. en 2016, probaron los efectos del estrógeno en células troncales células de ligamento periodontal (PDLSCs) procedentes de ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) en un biomaterial compuesto [nano-hidroxiapatita / colágeno / poli (L-lactida) (NhaC / PLA)], en el potencial de regeneración ósea; emplearon ratas hembras Sprague-Dawley a las que extrajeron las PDLSC que dividieron en 2 grupos: ratas ovx y ratas con operación simulada. Los constructos hechos con PDLSC + NhaC / PLA se implantaron por vía subcutánea en la espalda de ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) durante 12 semanas. Entre sus resultados encontraron que la proliferación de las PDLSC del grupo OVX fue significativamente mayor que la de las PDLSC provenientes de las ratas sanas. La mineralización de las PDLSC OVX fue significativamente más débil que la PDLSC SHAMy cuando fueron sembradas en el biomaterial la actividad de mineralización en las PDLSC OVX fue marcadamente disminuida. Cuando realizaron los implantes en ratones SCID, los constructos del grupo OVX tenían menor cantidad de hueso nuevo y material osteoide, por lo que además de concluir que la deficiencia de Estrógeno afecta el potencial de diferenciación osteogénica de PDLSC, el PLA jugo un papel muy importante pues en todos los tiempo permitió la biocompatibilidad, proliferación y diferenciación de las células sin importar las características de estas (Xu, 2016).

Smeets R y colaboradores en el 2016 (Smeets, 2016)publicaron un estudio en el que probaron andamios compuestos de PLA y β - fosfato tricálcico fabricados por fusión selectiva láser (SLM). Probaron la biocompatibilidad de sus andamios con las células troncales mesenquimales (MSC) y con células SAOS 2. Posteriormente implantaron los biomateriales en defectos de tamaño crítico mandíbula y la bóveda craneal en ratas demostrando que a los 30 días el defecto fue rellenado por tejido óseo *de novo*, lo que indica que el biomaterial de PLA se reabsorbió adecuadamente.


Ekin y colaboradores en 2016 (Ekin, 2016)determinaron la eficacia de un andamio (col / β -TCP) comparado con andamios de (PLA / PCL (policaprolactona)) en un modelo de defectos alveolares de tamaño crítico (7 x 4 x 3 mm) en ratas Sprague-Dawley que distribuyeron cuatro grupos: grupo A sin relleno, grupo B autoinjerto, grupo C andamio de col / β -TCP, y el grupo D con andamios de PLA / PCL y evaluaron 1 y 4 meses después de la cirugía. En sus resultados

encontraron que el grupo de autoinjerto fue el mejor con respecto a la formación de hueso nuevo y entre los grupos con andamio la tasa de volumen de hueso nuevo no tuvo diferencia no fue significativa por lo que ellos sugieren que el uso de andamios tienen un gran potencial como un tratamiento alternativo cuando el coste, la morbilidad, y la duración de la hospitalización son consideradas.

Rimondini y cols. probaron PLA/PGA (ácido 3-fosfoglicérico) en un modelo experimental con 10 conejos a los que les realizaron un defecto crítico de 6mm en el cóndilo femoral divididos en dos grupos: un grupo control y otro grupo al que le colocaron una membrana de PLA/PGA, y observaron que el grupo control no mostró hueso de curación después de 30 días, y a 90 días la formación de hueso nuevo en las cavidades sin tratar se mantuvo restringido a los bordes de los defectos. Por el contrario, los sitios con PLA/PGA observaron la formación de hueso nuevo en el interior de las cavidades tanto a los 30 como a los 90 días. En su grupo experimental las ganancias de hueso oscilaron entre el 11.46% y 76.82% después de 30 días y entre 75.98% y 95.34% al cabo de 90 días (Rimondini, 2005).

Xiaojun y colaboradores en 2014 (Xiaojun, 2014), probaron un biomaterial hecho con el polímero PEG(poli glicol etileno) más el polímero PLA y el uso de la biomolécula de BMP2 (Proteína morfogénica ósea 2 = Bone Morphogenetic Protein 2); realizaron un experimento con 12 conejos a los que les retiró la parte media del radio, que fueron divididos en cuatro grupos: un grupo control, un grupo al que le administró PLA, otro grupo al que le administraron BMP2(Bone Morphogenetic Proteins) en combinación con PLA y un cuarto grupo de PEG(poli glicol etileno) / PLA y BMP2. Analizaron su regeneración a 4, 8 y 12 semanas obteniendo como resultado que los grupos a los que se les colocó biomateriales obtuvieron una mayor área de hueso regenerado; siendo el grupo PEG/PLA/BMP2 el que mayor regeneración presentó, concluyendo que el PLA combinado con otros biomateriales favorece la regeneración ósea.

Jingfeng y cols. (Jingfeng Li, 2015), emplearon en su estudio el PLA en forma de microesferas compuestas de en combinación con CS (quitosano), el poli-péptido P24 y BMP2. Realizaron un defecto craneal con un diámetro de 5mm a 40 ratas de la cepa Sprague Dawley, que dividieron en cuatro grupos (n=10): grupo A: BMP2/ PLA/ CS, grupo B: P24(polipéptidos)/PLA/ CS, Grupo C : BMP2/ PLA/ CS/ P24, y grupo D: PLA/PS; sacrificándolas a las 6 y 12 semanas obteniendo como resultado que el grupo al que le administraron micro-



esferas compuestas de PLGA / CS cargado con BMP2 y P24 presento mayor cantidad y mejor calidad de regeneración de hueso en comparación con los demás grupos.

Tras observar los hallazgos realizados por estos autores podemos decir que es necesario establecer modelos de ensayo de regeneración ósea *in vitro* e *in vivo* que nos permitan investigar la biocompatibilidad, propiedades mecánicas, degradación y la interacción con el medio de cultivo o tejidos del huésped de nuevos biomateriales, ya que los resultados de los experimentos *in vitro* contribuyen significativamente a la evaluación de la respuesta celular y las pruebas *in vivo* representan el paso anterior a las pruebas clínicas humanas. Por estos motivos creemos que la utilización de un nuevo biomaterial hecho a base de PLA puede ser un biomaterial adecuados para implementar en la regeneración ósea.


V.- Justificación

En la Odontología actual, algunas de las patologías más frecuentes que muestran como consecuencia grandes defectos óseos son: labio y/o paladar hendido, traumatismos craneoencefálicos (TCE), periodontitis y cáncer de cabeza y cuello.

La incidencia a nivel mundial de hendiduras orofaciales es aproximadamente de 1 de cada 700 nacimientos (Mladina, 2008); en Estados Unidos la prevalencia es aproximadamente de 1 en 1000 nacimientos, y en México en promedio se reportaron 1,462 nacimientos anuales con estas patologías, con una tasa de incidencia 0.479 por cada 1000 nacimientos en el 2006 (Gómez Roberto, 2008).

Respecto a los TCE en el mundo anualmente más 1.1 millones de personas ingresan a un servicio de urgencias a consecuencia de estos. Se estima que en Estados Unidos cada año 1.5 millones de personas sufren un TCE y de ellos, aproximadamente 230,000 se hospitalizan (Cabrera, 2009), generando un déficit de 1.2 mil millones de dólares en costos hospitalarios (Tosounidisa, 2009). En México, el TCE es la cuarta causa de muerte a nivel nacional y la primera en personas de entre 15 a 45 años, con una mortalidad de 38.8 por cada 100 mil habitantes (Carrillo, 2015). El costo económico y social que generan los TCE es elevado, ya que el gasto directo anual que se invierte haciende a 4.5 billones de pesos aproximadamente y el gasto indirecto anual generado por incapacidades y pensiones corresponde a 33.3 billones de pesos (Ontiveros, 2014). En cuanto al costo social se reporta que tan sólo 40% de los sobrevivientes llega a reintegrarse a una actividad productiva después de una lesión de TCE debido a las secuelas que le impedirán o le dificultarán el retorno y readaptación a sus actividades anteriores en el ámbito social, académico, profesional y familiar (Junqué, 1999).

En cuanto, a la pérdida ósea debido a tumores, en el mundo se considera que se presentan alrededor de 500,000 nuevos casos de cáncer de cabeza y cuello cada año. En Estados Unidos cerca de 25,000 nuevos casos de cáncer oral y maxilofacial son registrados anualmente (Lung, 2007). En México durante el año 2000, se notificaron 1,389 casos de neoplasias localizadas



en labio, cavidad bucal y orofaringe, lo que representa el 1.51% de los 91,913 casos de neoplasias malignas registrados en dicho año (Carrillo Jorge, 2011).

En referencia a la enfermedad periodontal se considera una de las enfermedades más comunes a nivel mundial y una de las principales causas de pérdida dentaria y pérdida ósea alveolar. La Secretaria de Salud del 2010, reporto que la población en México diagnosticada con gingivitis y enfermedad periodontal fue en mujeres: 317,214 casos nuevos con una incidencia del 62% por cada 100,000 habitantes, y en hombres: 196 242 casos por con una incidencia del 38% por cada 100,000 habitantes (Secretaría de Salud, 2017). Esto se ve reflejado en el gasto público del país, ya que el 6% del ingreso per cápita en México se invierte en salud dental, pero sólo 20% de la población nacional tiene acceso a atención bucal básica (El economista, 2013).

En vista de los datos reportados y como respuesta al creciente número de pacientes que presentan defectos óseos en la región de cabeza y cuello y por consecuente, el aumento en los procedimientos quirúrgicos para tratarlos (un millón de procedimientos de injerto óseos realizado cada año mundialmente a una tasa de crecimiento de casi el 13% anual) (Wang, 2016), muchos de los centros de investigación están orientados al desarrollo de nuevos tratamientos basados en la IT con herramientas como los biomateriales. La búsqueda de nuevas terapias se centra en que sean aplicables a la clínica, efectivas, económicas, y que disminuyan el tiempo de recuperación para los pacientes. Por ello, esta tesis propone la utilización de una matriz de PLA como herramienta para tratar los defectos óseos en un modelo experimental.

VI.- Objetivos

VI.I. Objetivo General

- Comparar y valorar la regeneración ósea presente en los defectos óseos en un grupo de ratas tratadas con PLA en comparación con el grupo control.

VI.II. Objetivos Particulares:

- Evaluar la absorción y biocompatibilidad del PLA en defectos óseos mandibulares.
- Examinar las características histológicas de la zona donde se realizó la intervención quirúrgica, de cada uno de los grupos de estudio.
- Observar el grado de citocompatibilidad de un andamio de poli ácido láctico (PLA) a través de pruebas in vitro.

VII.- Hipótesis

VII. I. Hipótesis:

Si el biomaterial PLA empleado como relleno en un modelo de defecto óseo mandibular, mejorará la remodelación ósea, la rapidez y la calidad para inducir la regeneración ósea.

VIII.- Material y Métodos

VIII.I. Prueba de biocompatibilidad *in vitro*.

Los ensayos de citotoxicidad constituyen la fase inicial en las pruebas de biocompatibilidad de biomateriales y dispositivos médicos. Su función es detectar, de forma viable y reproducible, en un estadio temprano del proceso de prueba los efectos producidos sobre las funciones celulares, por ello antes de su aplicación en un modelo *in vivo*; nuestros andamios de PLA fueron sometidos a estudios de citotoxicidad y viabilidad celular *in vitro* para su posterior aplicación en modelos animales mediante las siguientes pruebas:

VIII.I.I. Ensayo de MTT.

Se incubó los discos de PLA al 10% y 6% y el control negativo en 5 ml de medio de cultivo estándar a 37°C, en un baño termostatzado con agitación. Se utilizaron células troncales derivadas de tejido adiposo de ratas Wistar donadas por el Grupo de Investigación en células Troncales e Ingeniería de Tejidos, las células fueron tripsinizadas por 5 min. a, 37 °C y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, se contaron para obtener una densidad celular de 1×10^4 . Posteriormente las células se sembraron sobre el biomaterial en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 1, 3, 5, 7 y 10 días a 37°C y 5 % de CO₂. A los tiempos anteriores se añadió 20 µl de MTT en cada pozo y se incubó por una hora a 37°C, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se agregó 20 µl de DMSO por pocillo para su posterior lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

VIII.I.II. Microscopía electrónica de barrido.

Para analizar la adhesión y morfología celular sobre el PLA por microscopía electrónica de barrido, incubamos células mesénquimales de tejido adiposo de rata a 1, 3, 5, 7 Y 10 días a 37°C y 5 % de CO₂, posteriormente se colocaron los discos estériles de biomaterial en placas de 24 pocillos; las células fueron sembradas directamente sobre el PLA con una micropipeta. Después de 24 horas de incubación, se eliminó el medio de cada pocillo, se lavó con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído. Después de cada adición, las muestras se lavaron en el tampón; se deshidrataron en un gradiente de solución de etanol, en seguida se secaron con acetato de uranilo en etanol 70%-v y de nuevo se deshidrataron con soluciones de etanol. Las muestras se llevaron hasta el punto crítico de secado. Posteriormente se secaron a 37°C durante 2 horas para su posterior observación por ser microscopia electrónica de barrido.

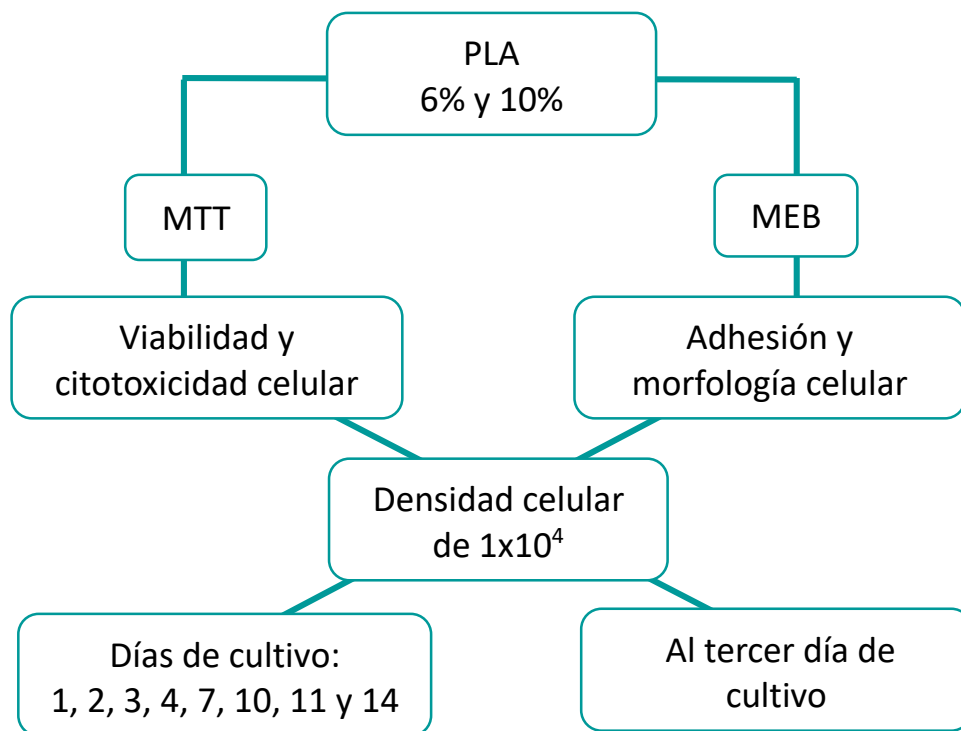


Figura 10. Esquema sobre la metodología de las pruebas in vitro

VIII.II. Prueba de biocompatibilidad *in vivo*.

VIII.II.I. Grupos de estudio.

Todos los procedimientos realizados en la presente tesis fueron realizados con apego a la norma mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre el manejo de animales de laboratorio, y con la aprobación y los estándares establecidos por el consejo de Bioética de la FES Iztacala bajo el folio 1074. Durante el periodo de experimentación, los especímenes se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a una temperatura de entre 21 -27 ° C en donde se les proporciono acceso *ad libitum* de agua y comida, y fueron monitoreadas cada tercer día para supervisar la cicatrización y comportamiento.

El procesamiento de los desechos residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) como: cadáveres, serrín de las camas de los especímenes, suturas, bisturís, etc., se manejaron cuidadosamente de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-200, los desechos químicos se manejaron con base en la norma NOM- 052-SEMARNAT-2005, NOM-054-ECOL-1993, NOM-007-SCT2-2002 y NOM-003-SCT-2008 así como avalados por comisión de Bioseguridad de la FES Iztacala bajo el folio 036.

Para la realización de esta tesis se emplearon 48 ratas de la cepa Wistar, machos de entre 250g y 300g los cuales se dividieron en grupos (n=6) en cuatro tiempos de estudio (7,14, 21 y 30 días) separados en 2 grupos de 24 ratas cada uno como se muestra en la Figura 11.

- Grupo A (Grupo control): Son mandíbulas sanas en condiciones normales, que sirven como comparación para nuestro estudio (se utilizaron las mandíbulas izquierdas del grupo sham. Total 6 animales por cada periodo de estudio (24 mandíbulas izquierdas).
- Grupo B (Grupo sham): Elaboración de un defecto óseo crítico en la mandíbula derecha de los especímenes con un diámetro de 4x2x1mm. Total 6 animales por cada periodo de estudio (24 mandíbulas derechas).

- Grupo C (Grupo con PLA): Elaboración de un defecto óseo crítico en la mandíbula derecha de los especímenes con un diámetro de 4x2x1mm y un implante de membrana de PLA (preparada con 10 gr de PLA con por 75ml de cloroformo y 25 ml de etanol) de forma rectangular con unas dimensiones de 3x2 mm con un grosor de 5 micras. Total 6 animales por cada periodo de estudio (24 mandíbulas derechas).

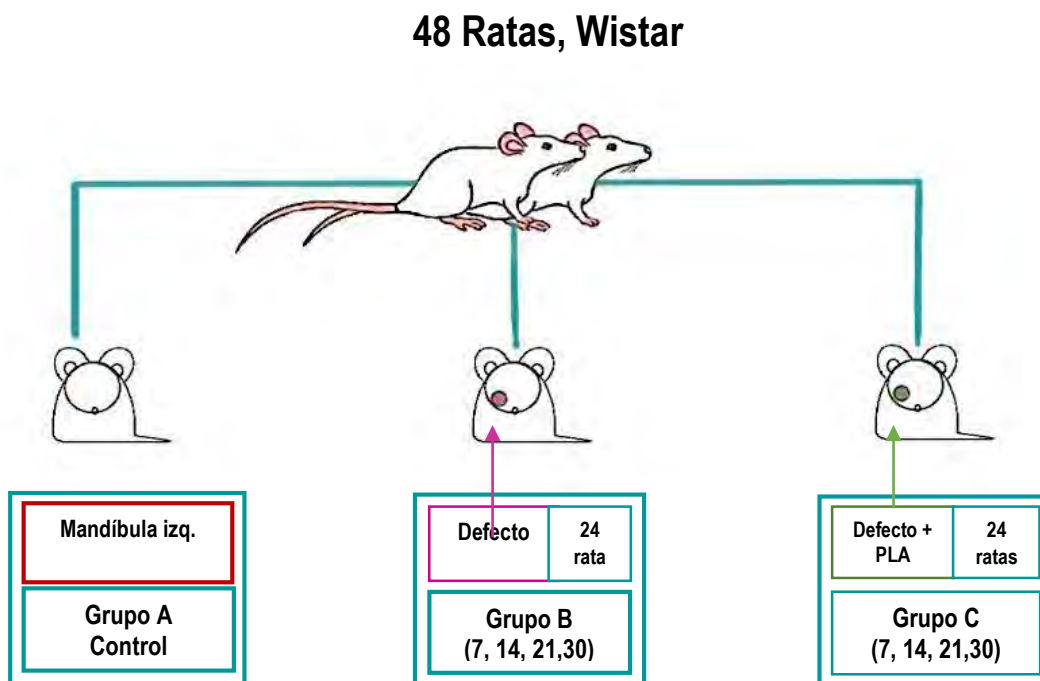


Figura.11. Esquema de los grupos de estudio utilizados.

VIII.I.II Defecto crítico mandibular (Técnica quirúrgica).

Tabla-5. Material utilizado para la realización del defecto crítico.

Material

Papel	Recubrimiento del área de trabajo.
Anestésico y relajante muscular	Sedación e inmovilización del espécimen.
Jeringas de insulina	Colocar el anestésico al espécimen.
Base de plástico	Superficie donde se coloca al espécimen.
Cinta adhesiva	Sujetar al espécimen a la base de plástico.
OH 70	Limpieza de la zona.
Lámpara	Iluminar y mejorar la visión del área de trabajo.
Rasuradora	Limpiar la zona de trabajo de agentes contaminantes.
Campos estériles	Mantener el campo quirúrgico aislado.
Guantes estériles	Mantener estéril la zona quirúrgica
Bacula	Pesar al espécimen.
Micromotor	Realización del defecto por medio de rotación.
Fresas de carburo de baja velocidad del #1/2 o 1	Realización del defecto por medio de rotación.
Suero fisiológico	Mantener humectado el hueso y evitar necrosis.
Jeringa de 20 ml	Irrigar el hueso.
Gasas	Absorber el excedente de líquidos y limpieza de la herida.
Regla y Plumón	Realizar la medición de la incisión.
Biomaterial (PLA)	Material a colocar.
Antiséptico	A colocar en la zona donde se realizó la incisión.
Material quirúrgico	Realización del acto quirúrgico (mango de bisturí, pinzas de mosco curvas, pinzas porta sutura, tijeras, sonda periodontal, empacador de hilo retractor).
Sutura	Suturar la herida quirúrgica,
Cámara fotográfica	Captura de fotos.
Barreras de protección desechables	Guantes, cubre bocas, gorro y bata quirúrgica.

La intervención quirúrgica del defecto mandibular se realizó en el quirófano del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, se efectuó un lavado de las superficies del quirófano con papel sanita y OH al 70°, a continuación, se colocó un campo estéril en el área y se instaló el instrumental a utilizar (Figura 12). Se pesaron los especímenes y se anestesiaron mediante un coctel de Ketamina (60mg/kg) con Xilazina (7mg/kg) utilizando su peso y la Tabla 5 para calcular la dosis de administración.

Tabla-6. Tabla utilizada para calcular la dosis de anestésico

Clorhidrato de Ketamina			
60 mg	-----	1000mg	→
X	-----	Peso del animal	→
100mg	-----	1mL	
Resultado	-----	X mL	
Xilazina			
7 mg	-----	1000mg	→
X	-----	Peso del animal	→
20 mg	-----	1mL	
Resultado	-----	X mL	

Con el animal anestesiado se prosigió a rasurar la zona yugal y despejar las vías aéreas superiores sacando la lengua del espécimen posteriormente, se colocó en una base de plástico y se sujetó por las extremidades con cinta adhesiva, en seguida se le colocó por encima un campo hendido estéril y se situó antiséptico en la zona a tratar, para subsiguientemente realizar una incisión de 2 centímetros de longitud; nítida y de una sola intención de arriba hacia abajo y que solo involucró la dermis, posteriormente se hizo disección roma con pinzas de mosco curvas para separar la capa muscular y exponer la superficie ósea mandibular (Figura12).

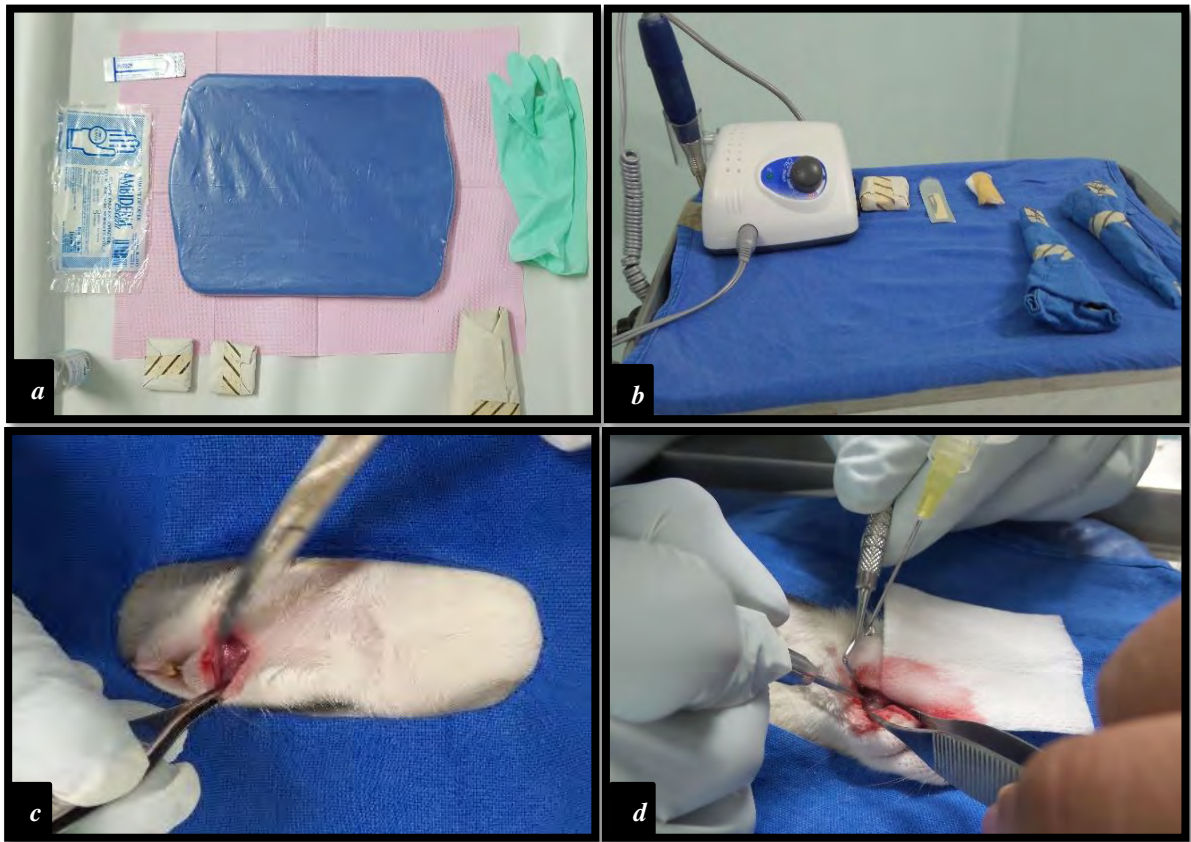


Figura 12. a) Mesa de trabajo con el instrumental ordenado que se utiliza para la cirugía, b) Mesa de mayo con el resto del material empleado, c) Separación de músculo, y d) Realización del defecto crítico.

Una vez expuesta la mandíbula del espécimen, se prosiguió a efectuar el defecto crítico, el cual se realizó en el cuerpo de la mandíbula hacia el borde de esta, anterior a los molares, por debajo del foramen del nervio mentoniano y posterior al diente incisivo como se observa en la Figura 13, con una fresa quirúrgica de bola de 1 ½ y un micromotor de baja velocidad a no más de 1200 rpm, manteniendo irrigación constante con suero fisiológico para evitar necrosis del hueso, con unas dimensiones de 3x2x1mm (Ramírez, 2015).

Consecutivamente, se colocó la membrana de PLA, previamente esterilizada y humedecida con suero fisiológico en los grupos experimentales y por último, se afrontaron los tejidos con suturas absorbibles (catgut) de 000 por planos utilizando la técnica de puntos separados para evitar en la medida de lo posible la dehiscencia en la herida. Posterior a la cirugía, los especímenes se mantuvieron en el Bioterio de FES Iztacala en una caja con acceso a

alimento y agua *ad libitum* con ciclos 12:12 de luz/obscuridad y una temperatura promedio de entre 21 ° -27 ° C. y se mantuvieron bajo observación constante.

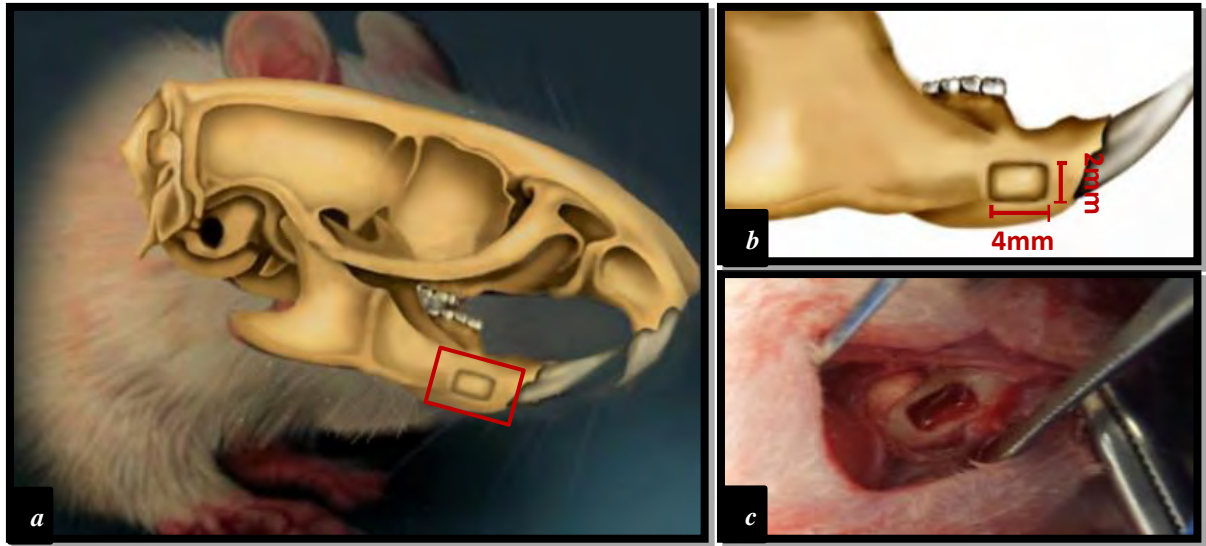


Figura 13. a) Zona anatómica en la que se realiza el defecto, (Modificada para su uso Raposo- Amaral 2014); b) Medidas considerables para la clasificación de defecto crítico; c) Foto clínica de la realización del defecto crítico.

VIII.I.III Toma de la muestra y análisis radiográfico.

Posterior a la cirugía, y transcurridos los tiempos de estudio (7, 14, 21 y 30 días) se realizó el sacrificio de los especímenes por sobreexposición a CO₂, se capturaron fotos inmediatas post mortem (Figura 14) para la evaluación macroscópica de la zona de intervención quirúrgica posteriormente, se extrajo la mandíbula de cada espécimen y se colocó en un casete para su posterior procesamiento, radiológico e histológico.

El grado de inflamación se evaluó revisado los signos, tumefacción y pérdida de la función (Tabla-7), en la zona de la herida mientras los especímenes estaban vivos; en cuanto a la evaluación de la cicatrización del tejido se evaluó el porcentaje de re-epitelización y cierre de la herida tomando en cuenta si esta estaba cerrada o no. Se evaluó también la mortalidad, morbilidad, y capacidad para alimentarse.

Tabla-7. Escala de signos revisados para evaluar el grado de inflamación

Inflamación severa:	Con presencia de enrojecimiento notable en la zona de la herida; así como, pérdida o disminución de la función (el espécimen no pudiese masticar o mover la mandíbula).
Inflamación moderada:	Enrojecimiento leve en zona de la herida y presencia de tumefacción que aumentara el volumen del tejido.
Inflamación leve	Presencia de tumefacción ligera que aumentara levemente el volumen.
No presentó inflamación	En todos aquellos especímenes en los cuales la herida se encontrara intacta, sin aumento de volumen ni enrojecimiento y que mantenía sus funciones normales de masticación y movimiento mandibular.

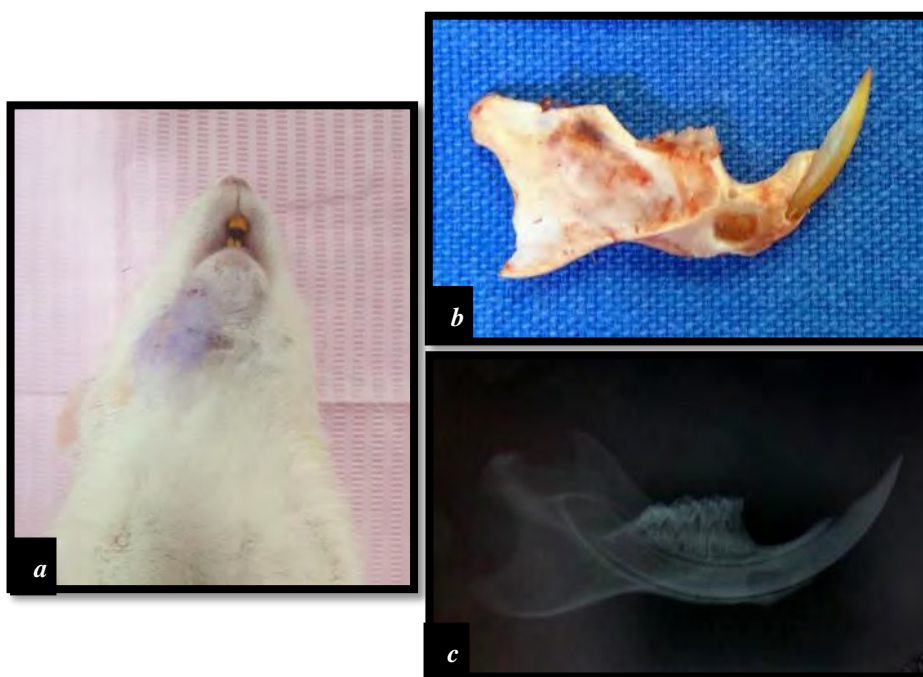


Figura 14. a) imagen post mortem; b) mandíbula extraída; c) radiografía de la mandíbula posterior al sacrificio.

El estudio radiográfico del área del defecto mandibular se realizó mediante tomas a 32 Kv en un tiempo de 0.4 segundos como parámetros estandarizados en todos los grupos de estudio, con una película periapical intraoral de la marca Kodak. Las radiografías fueron realizadas en el momento posterior al sacrificio en cada uno de los especímenes con el objetivo de comprobar el estado del defecto y la mineralización previa al procedimiento de descalcificación de la muestra Figura 14.

VII.IV. Procesamiento histológico de la muestra.

Una vez realizados los estudios radiológicos la muestra se colocó en un frasco de vidrio con Osteosoft®, en el donde se realizó la fijación y descalcificación de la muestra durante 4 semanas, para su posterior procesamiento histológico. Una vez transcurrido el tiempo en Osteosoft® la muestra se colocó en un vaso de precipitados y se le realizó varios lavados con agua corriente por varios minutos hasta retirar el exceso de Osteosoft® posteriormente, se tomó una segunda radiografía para comprobar el nivel de descalcificación. Para su estudio, las muestras se deshidrataron para su inclusión en parafina, siguiendo el protocolo a continuación:

Tabla-8. Técnica y tiempos de deshidratación e inclusión

Tren de deshidratación e inclusión

Alcohol al 70%	1 hora
Alcohol al 80%	1 hora
Alcohol al 90%	1 hora
Alcohol al 96%	1 hora
Alcohol al 100%	1 hora
Alcohol 100%-Acetato n-butilo (1:1)	40 minutos
Acetato n-butilo	40 minutos
*Acetato n-butilo-Parafina (1:1)	20 minutos

*Parafina I	2 horas
*Parafina II	2 horas

* Estos pasos deben realizarse en la estufa a 60°C.

Posterior a la deshidratación y una vez transcurrido el tiempo en Parafina II las muestras fueron incorporadas en moldes con parafina líquida a 60°C y orientadas en la posición correcta para ser cortadas con un micrótopo. Se realizaron cortes seriados de la parte central del defecto de 5-7 μ de espesor y puestos para su expansión en un baño de agua (Figura 15), siendo pescados con porta objetos previamente poli-lisinados por 5 minutos y llevados al horno durante 1 hora para lograr la adherencia de la muestra en estos.

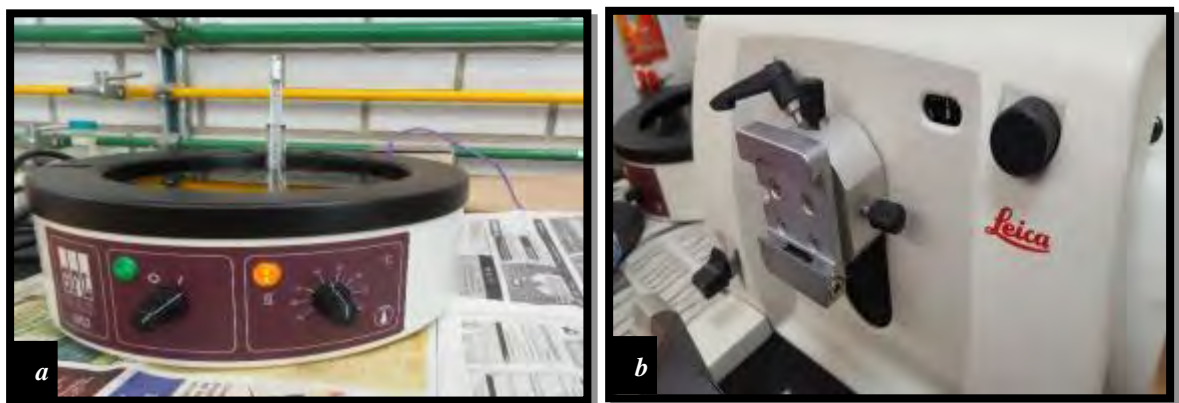


Figura 15. a) Baño utilizado para la expansión y pesca de las muestras; b) Micrótopo utilizado para la realización de los corte de la muestra.

Posteriormente, los cortes obtenidos en los portaobjetos fueron llevados al horno a 60°C donde estuvieron 2 horas mínimo para eliminar la parafina, transcurridos el tiempo en el horno, se procesaron siguiendo la técnica que se muestra en la Tabla-9 para ser teñidos con hematoxilina-eosina y observados en un microscopio.

Tabla-9. Técnica y tiempos utilizados en la tinción de Hematoxilina-Eosina.

Tinción Hematoxilina-eosina	
Xilol I	5 minutos.
Xilol II %	5 minutos.
Alcohol etílico absoluto	Varios baños
Alcohol etílico al 96%	3 minutos
Alcohol etílico al 90 %	3 minutos
Alcohol etílico al 80 %	3 minutos
Alcohol etílico al 70 %	3 minutos
Agua corriente	3 minutos
Hematoxilina de Harris	5 a 7 minutos.
Agua corriente	Lavar hasta quitar el exceso de colorante
Alcohol ácido al 1%	Lavar rápidamente
Agua corriente	Lavar rápidamente
Agua amoniacal	Hasta virar a azul
Agua corriente	Lavar rápidamente
Eosina	5 minutos
Alcohol etílico al 96%	30 segundos
Alcohol etílico absoluto	3 minutos
Alcohol etílico absoluto 5 minutos	5 minutos
Xilol I 5 minutos	5 minutos
Xilol II 5 minutos	5 minutos

IX.- Resultados

IX.I.- Resultados *in vitro*.

IX.I.I. Resultados del ensayo de MTT.

Los resultados registrados por la lectura de la densidad óptica en el ensayo de MTT mostraron que al término de los 14 días la absorbancia del formazán producido por las MSCat's sobre el biomaterial de PLA al 10 % fue mayor en comparación con el PLA al 6% y el control, además esta mantuvo un crecimiento constante desde el día uno hasta el día 14; esto demostró que la viabilidad celular en el PLA al 10% fue mayor en comparación con los demás grupos, también podemos deducir que el biomaterial en general, no es toxico debido a que tanto el PLA al 6 y 10% permitieron la proliferación y adherencia de las células sobre estos.

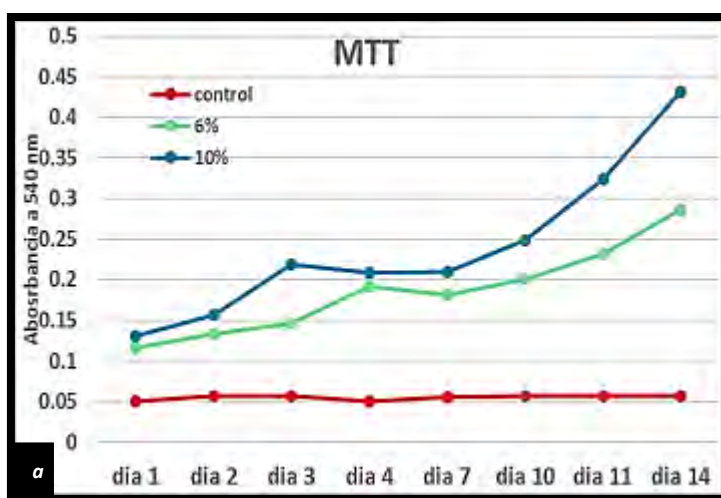


Figura 16. Grafica donde se puede observar los resultados de la prueba de viabilidad por MTT con el biomaterial de PLA al 6 y 10% con MSCat's a los días 1, 2, 3, 4, 7, 10, 11 y 14.

IX.I.II. Resultados del MEB.

En los resultados obtenidos por el MEB, observamos que las células se adhirieron a la superficie del biomaterial. Las células presentes en el PLA son de aspecto alargado y aplanado con un gran número de extensiones unidas a la estructura del biomaterial (adherencia celular), se puede observar un mayor número de células adheridas a la superficie del PLA al 10% en comparación con las observadas en el PLA al 6%. Igualmente, se puede observar la morfología del biomaterial, la cual es porosa e irregular en ambos porcentajes, además se puede distinguir que el diámetro del poro en el biomaterial de PLA al 10% es de mayor tamaño en comparación con el diámetro del poro del PLA al 6%.

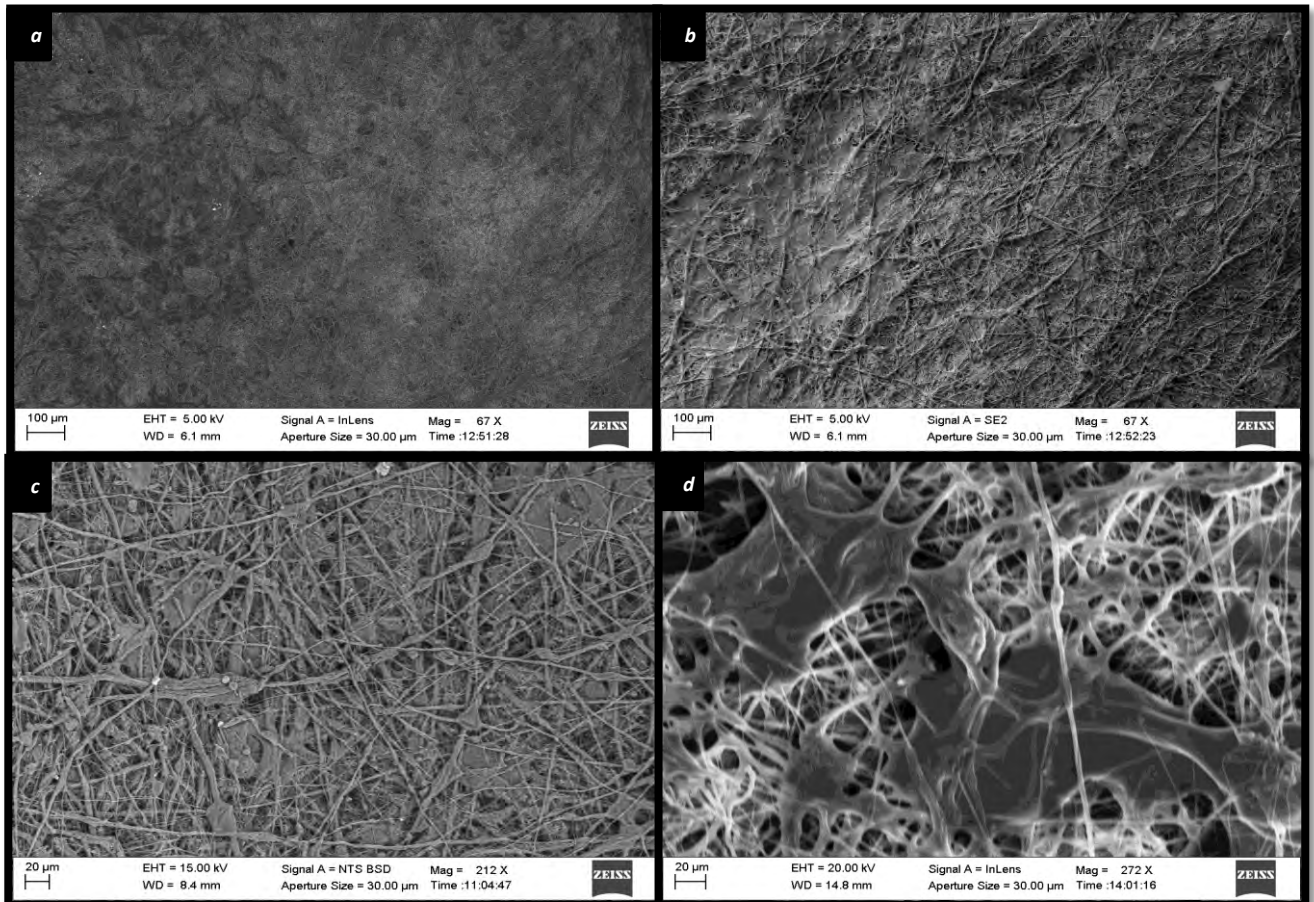


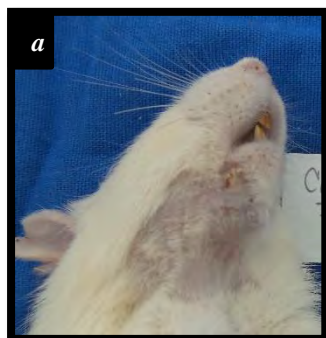
Figura 17. Fotografías a) SEM de PLA al 6 % con MSCat's en el 3er día de cultivo (67x); b) SEM de PLA al 10% con MSCat's al 3er día de cultivo (67x); c)SEM de PLA al 6% con MSCat's al 3er día de cultivo (212x); d) SEM de PLA al 10% con MSCat's al 3er día de cultivo (272x).

IX.II.-Resultados macroscópicos.

IX.II.I. Resultados macroscópicos del grupo sham.

Los resultados del grupo control fueron los siguientes:

- De los 24 especímenes utilizados en este estudio que se intervinieron quirúrgicamente, no hubo ningún fallecimiento durante ni después de la intervención quirúrgica. El porcentaje de mortalidad fue 0%.
- Ninguno de los especímenes presentó complicaciones post quirúrgicas como fracturas o alguna otra alteración, por lo que hubo 0% de morbilidad.
- En cuanto a la alimentación los especímenes consumieron agua y comida normalmente en todos los momentos posteriores a la cirugía
- Ningún espécimen presentó proceso infeccioso.
- Todos los especímenes cicatrizaron normalmente.



Grupo control de 7 días:

Se observó inflamación leve en el área de la intervención quirúrgica en un 80% de los especímenes de este grupo, el 20% restante no presentó inflamación evidente; la cicatrización fue de un 100% en las 6 ratas, no se observaron signos de infección en la zona.



Grupo control de 14 días:

No se observó inflamación en el área de la intervención quirúrgica en ningún espécimen, la cicatrización se observó totalmente cerrada en el 100% de las ratas de este grupo y no se observaron signos de infección en la zona.



Grupo control de 21 días:

El 100% de especímenes no presentaron inflamación en el área de la intervención quirúrgica, la cicatrización se observó totalmente cerrada en todas de las ratas de este grupo, no se observaron signos de infección en zona.



Grupo control de 30 días:

No se observó inflamación en el área de la intervención quirúrgica en ningún espécimen, la cicatrización se observa totalmente cerrada en el 100% de las ratas de este grupo y no se observaron signos de infección en zona.

Figura 17. Fotografías representativas del grupo sham a los tiempos experimentales a) grupo de 7 días; b) grupo de 14 días; c) grupo de 21 días y d) grupo de 30 días.

Fotografías postmortem del grupo control.

Se observa una hemimandíbula intacta del grupo control, en la que podemos apreciar la anatomía normal con tres zonas distintas, una zona posterior en la que se localiza la rama de la mandíbula con el proceso condilar, además del proceso coronoides y al angular, en la zona media existe hueso cortical poco inervado, se observa la línea oblicua externa y por arriba de ella el agujero mentoniano que conduce el nervio mentoniano, en la parte superior de esta zona localizamos los molares, en la zona anterior se compone de hueso que recubre la raíz del incisivo central y la corona de este. En cuanto al corte Histológico podemos observar que el

tejido óseo se encuentra externo al ligamento periodontal y dentina y presenta una continuidad y una estructura normal.

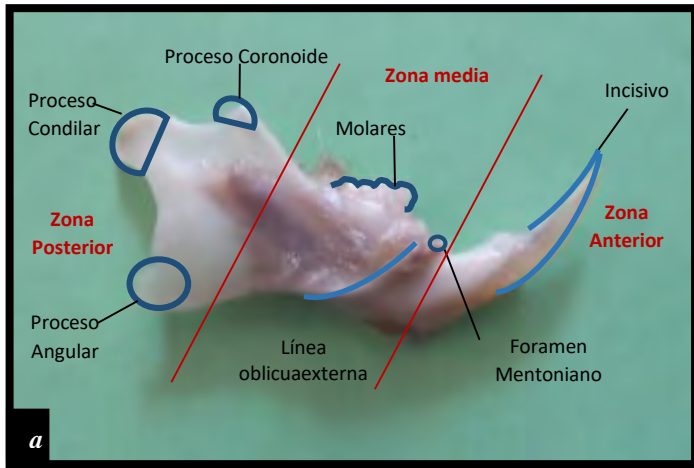


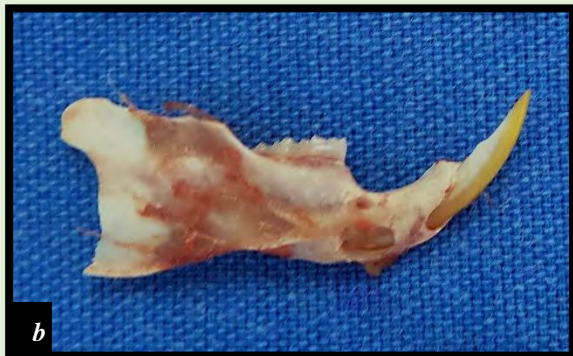
Figura 18. a) Fotografía de la mandíbula en el grupo control con señalización de las zonas anatómicas más importantes; b) Foto de corte histológico a 5x teñido con hematoxilina con eosina donde es D) Dentina L) Ligamento TO) tejido óseo P) pulpa dental.

Fotografías postmortem del grupo sham.



Grupo sham 7 días

En el área del defecto mandibular a los 7 días se observó el defecto evidente de apariencia rectangular de color rojizo de dimensiones similares al día de la cirugía.



Grupo sham 14 días

A los 14 días el área del defecto se observó ligeramente reducida de los bordes hacia el centro, además de estar relleno de un tejido de apariencia granular.



Grupo sham 21 días

EL área del defecto a los 21 días se observó de dimensiones menores, de apariencia irregular con presencia de tejido granular de color rojizo.



Grupo sham 30 días

A los 30 días el área de defecto presentó una forma irregular y se observó reducida de los bordes hacia el centro, sin presencia de tejido de relleno.

Figura 19. Fotografías postmortem representativas del grupo control sham a los tiempos experimentales; a) grupo de 7 días; b) grupo de 14 días; c) grupo de 21 días y d) grupo de 30 días.

IX.I. II. Resultados macroscópicos del grupo Experimental.

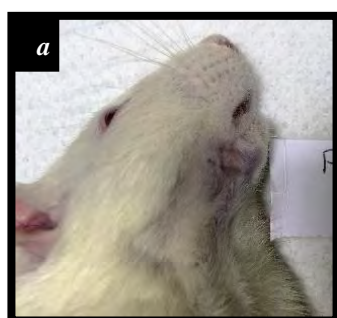
Los resultados del grupo experimental fueron los siguientes:

- De los 24 especímenes utilizados para este grupo que se intervinieron quirúrgicamente, no hubo ningún fallecimiento ni durante ni después de la intervención quirúrgica, porque el porcentaje de mortalidad de este grupo fue 0%.
- En cuanto a la alimentación los especímenes consumieron agua y comida normalmente en todos los momentos posteriores a la cirugía
- Sólo 1 de los especímenes presentó infección, el resto no presentó alguna otra complicación por lo que el porcentaje de morbilidad de fue de 4.16%, el espécimen que presentó infección no se consideró ni fue evaluado en otro rubro.
- Todos los especímenes cicatrizaron normalmente.



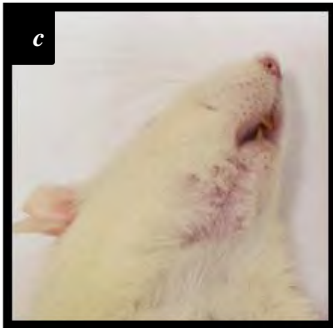
Grupo control de 7 días:

A los 7 días se observó inflamación leve en la zona de la intervención quirúrgica en 3 de los 6 especímenes.



Grupo control de 14 días:

En el grupo de 14 días uno de los especímenes presentó infección, con inflamación de la zona del defecto, el resto de los especímenes no presentaron inflamación.



Grupo control de 21 días:

En los grupos de 21 días no se observó inflamación en el área de la intervención quirúrgica en ningún espécimen, la piel se observó totalmente cerrada en el 100% de los especímenes y no se observaron signos de infección.



Grupo control de 30 días:

A los 30 días no se observó inflamación en el área de la intervención quirúrgica en ningún espécimen, la piel se observó totalmente cerrada en el 100% de los especímenes y no se observaron signos de infección.

Figura 20. Fotografías representativas del grupo sham a los tiempos experimentales; a) grupo de 7 días; b) grupo de 14 días; c) grupo de 21 días y d) grupo de 30 días.

Fotografías posmortem del grupo con PLA.



Grupo PLA 7 días

Zona del defecto mandibular a los 7 días donde se observa que existe una delimitación con medias similares al día de la cirugía rellena de PLA que se ve poco integrado al hueso y con un color rosado.



Grupo PLA 14 días

A los 14 días se puede observar una mayor integración del PLA con el hueso con un cambio de coloración a amarillo, las dimensiones de la zona del defecto no se ven aparentemente reducidas.



Grupo PLA 21 días

El área del defecto a los 21 días se observó con una buena integración de del PLA, no se observaba una delimitación de la zona del defecto.



Grupo PLA 30 días

El área del defecto a los 30 días se observó relleno de un tejido de apariencia similar al hueso

Figura 21. Fotografías post-mortem representativas del grupo experimental con PLA a los tiempos experimentales; a) grupo de 7 días; b) grupo de 14 días; c) grupo de 21 días y d) grupo de 30 días.

Fotografías de la zona del defecto comparado el grupo sham y el grupo con PLA.

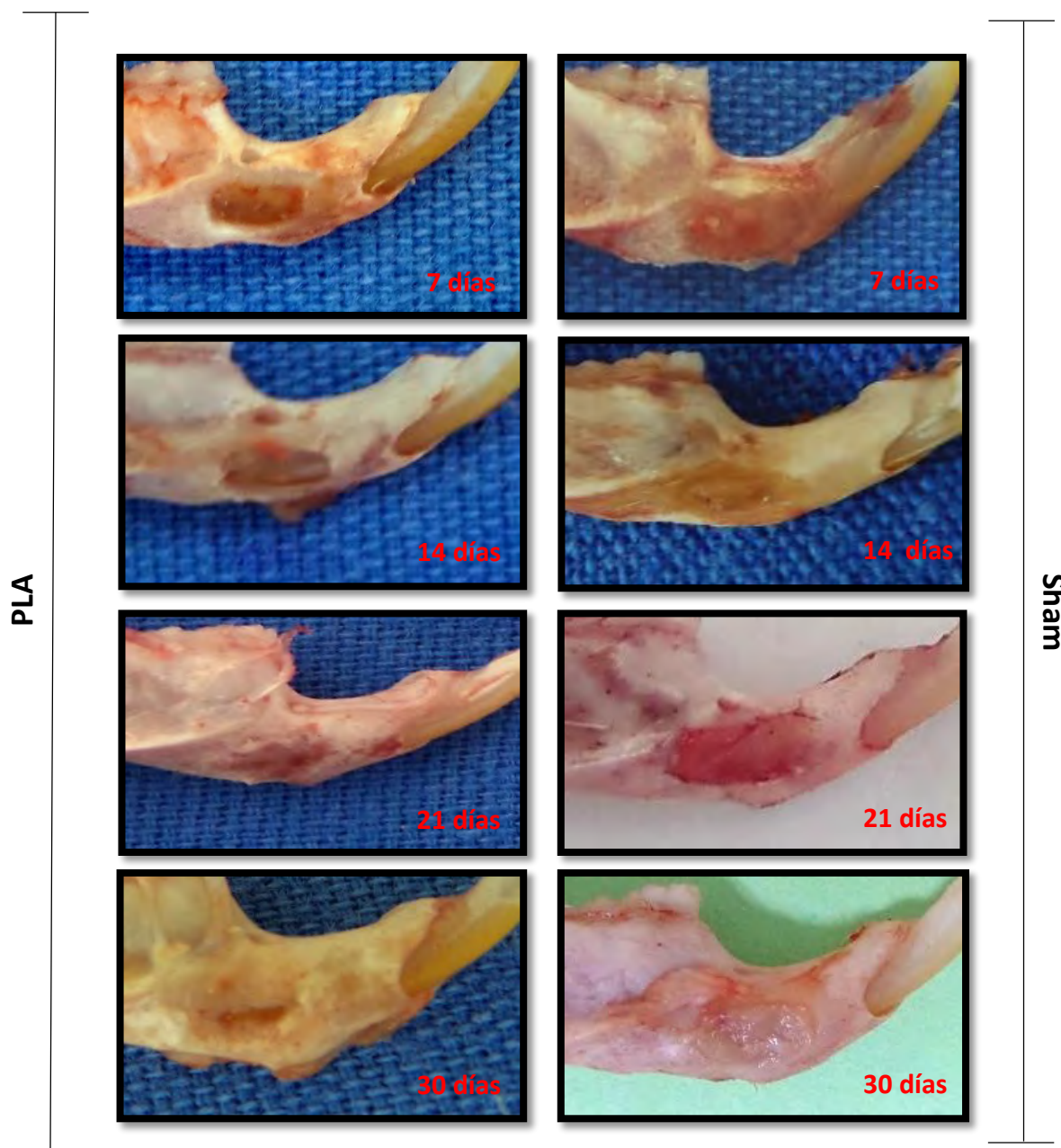


Figura 22. Fotos post-mortem con acercamiento en la zona del defecto del grupo experimental con PLA a los tiempos experimentales (7, 14, 21 y 30 días), en comparación con el grupo sham a los tiempos experimentales (7, 14, 21 y 30 días).

IX.II- Resultados radiográficos.

IX.II.I. Resultados radiográficos del grupo sham.

Grupo control de 7 días: En este grupo se observó el defecto óseo perfectamente delimitado justo por debajo de la línea oblicua externa de la mandíbula y se continúa hasta borde basal mandibular y llega justo por debajo de las raíces de los molares inferiores con una forma rectangular y radiolúcida con bordes nítidos y continuos.

Grupo control de 7 días: A los 14 días la radiografía se mostró una disminución en la radiolucidez con que se distingue el defecto, pero no se observa una disminución en el tamaño ni la forma del defecto, se sigue observando el área donde se realizó el defecto con dimensiones similares al grupo de 7 días.

Grupo control de 7 días: En el grupo de los 21 días aún podemos observar la zona donde se realizó el defecto, aunque con ligera disminución de tamaño y un cambio en su forma, se observaron bordes redondeados.

Grupo control de 7 días: El área del defecto presente en este grupo continuó siendo evidente con dimensiones menores en comparación con los grupos anteriores, y bordes poco nítidos.

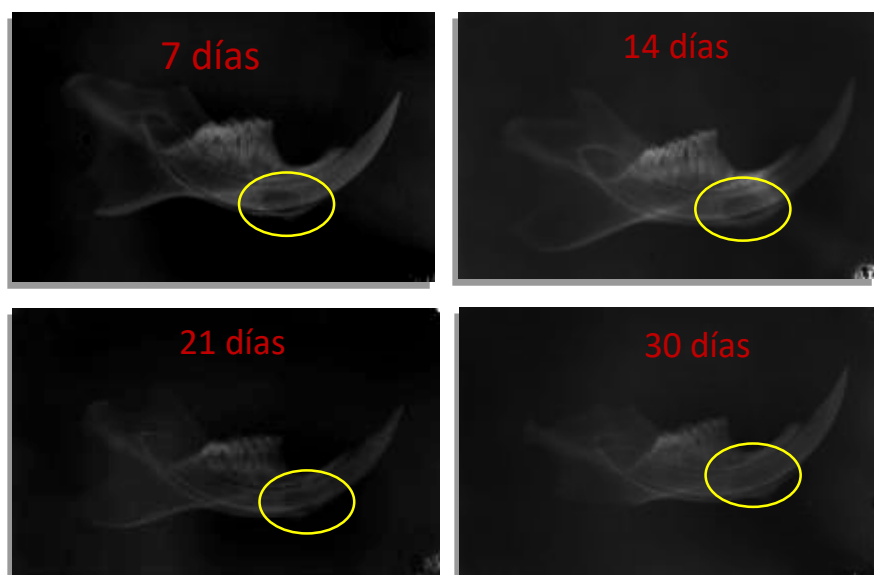


Figura 23. Fotografías representativas de las radiografías del grupo sham a los tiempos experimentales 7, 14, 21 y 30, donde podemos ver el área del defecto encerrada con un círculo amarillo.

IX.II.II. Resultados radiográficos del grupo Experimental.

Grupo PLA de 7 días: En este grupo de 7 días con PLA podemos distinguir el defecto óseo perfectamente delimitado con una forma rectangular y radiolúcida, con bordes nítidos y continuos en el área donde se realizó el defecto, el PLA no se distingue debido a su densidad.

Grupo PLA de 14 días: Se muestra una disminución en la radiolucidez pero aún se observa el defecto con las mismas dimensiones que en el grupo de 7 días.

Grupo PLA de 21 días: Aún se observó el área donde se realizó el defecto, aunque con una disminución de tamaño y un cambio en su forma, comparado con el grupo 14 días, la evidencia es que la radiolucidez disminuyó.

Grupo PLA de 30 días: El área defecto presente en este grupo fue poco evidente, no se puede distinguir fácilmente la forma ni tamaño del defecto.

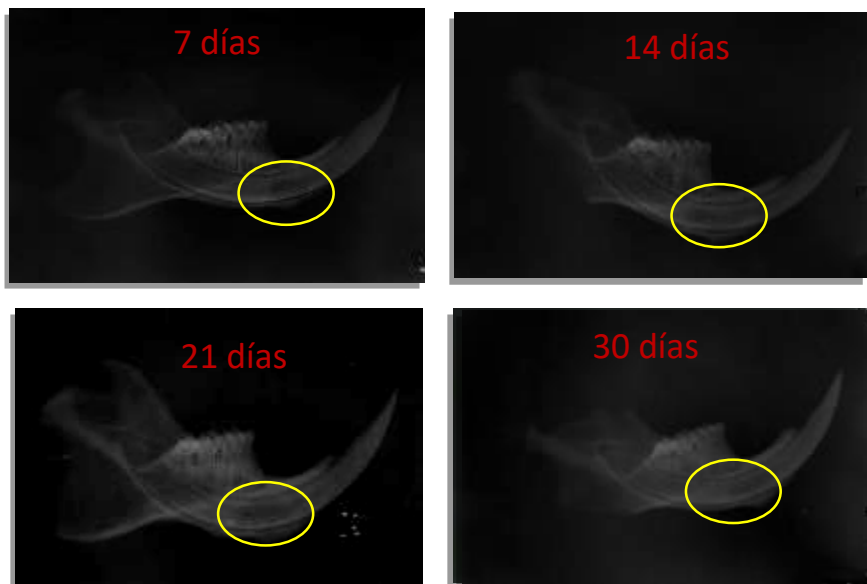


Figura 24. Fotografías representativas de las radiografías del grupo experimental a los tiempos experimentales 7, 14, 21 y 30 donde podemos ver la zona del defecto encerrada con un círculo amarillo.

IX.III- Resultados Histológicos.

IX.III.I.-Resultados Histológicos del grupo sham

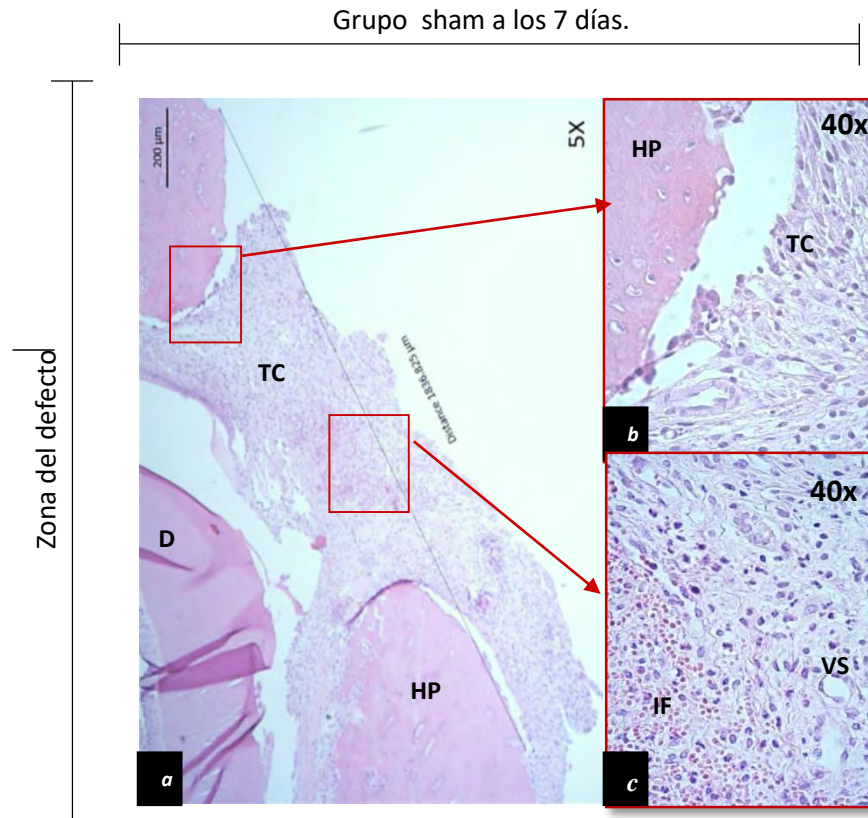


Figura 25. Fotografía en microscopía óptica con tinción H-E del grupo sham a los 7 días, a) muestra un corte de la zona del defecto a 5x; b) Acercamiento a zona de interés a 40x c) Acercamiento a zona de interés a 40x. D-dentina, L-ligamento periodontal, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, IF-infiltrado inflamatorio, VS-vaso sanguíneo.

En las imágenes tomadas por microscopía óptica del grupo sham a los 7 días, podemos claramente observar que en el área del defecto en los bordes se observa el hueso sano preexistente de apariencia normal y en el sitio del defecto se observó un relleno de aparenta ser infiltrado inflamatorio y tejido de tipo conectivo.

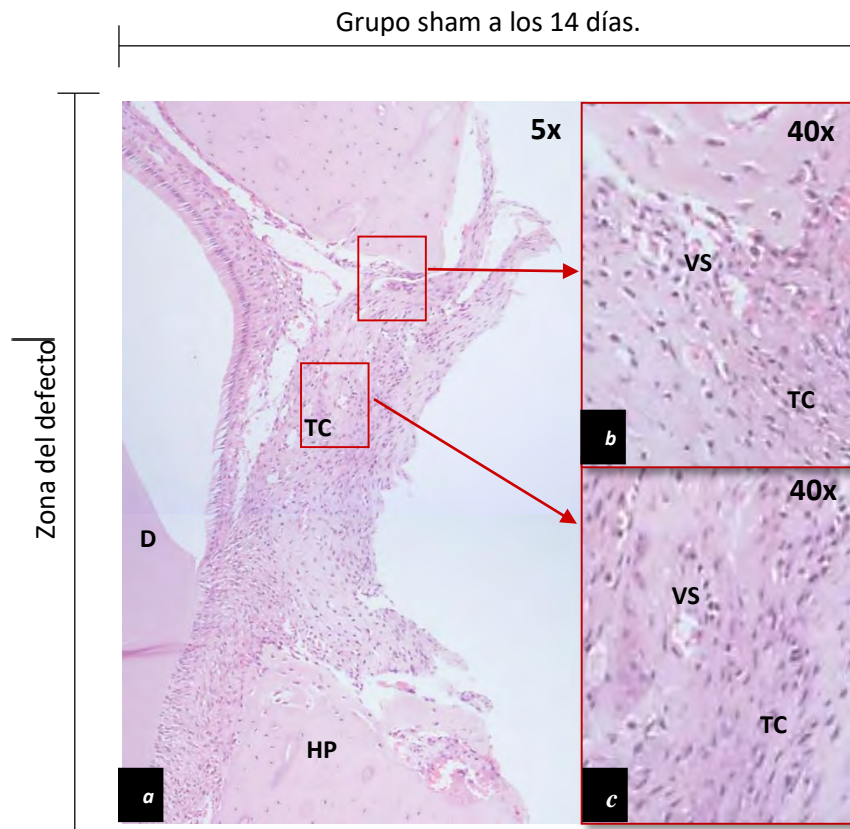


Figura 24 Fotografía en microscopía óptica con tinción H-E del grupo sham a los 14 días; a) muestra un corte de la zona del defecto a 5x, b) Acercamiento a zona de interés a 40x c) Acercamiento a zona de interés a 40x. D-dentina, L-ligamento periodontal, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, VS-vaso sanguíneo.

En las muestras histológicas observadas mediante microscopía óptica del grupo sham a los 14 días, observamos que el área del defecto se encontraba rellena de tejido conectivo, como fue tocado el ligamento periodontal, éste promovió el relleno del defecto por células similares a fibroblastos, también observamos neo-vascularización de la zona y áreas con lo que parece ser infiltrado inflamatorio en la parte central del defecto y células del tejido conectivo.

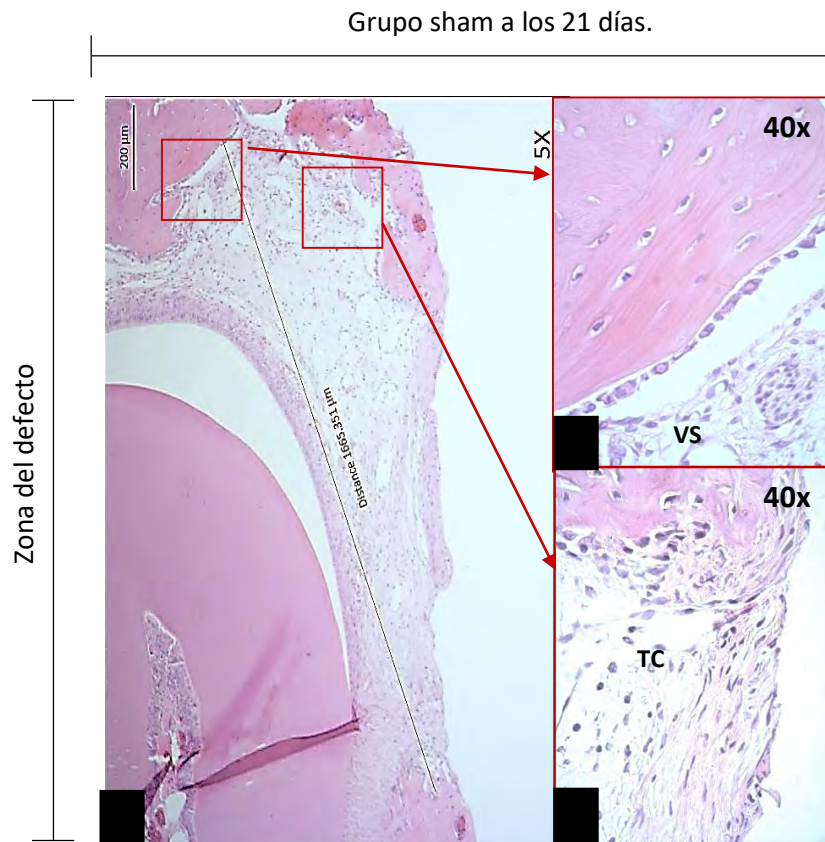


Figura 25. Fotografía en microscopía óptica con tinción H-E del grupo sham a los 21 días, a) muestra un corte de la zona del defecto a 5x, b) Acercamiento a zona de interés a 40x c) Acercamiento a zona de interés a 40x. D-dentina, L-ligamento periodontal, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, VS-vaso sanguíneo, ON-tejido óseo nuevo.

En las muestras histológicas del grupo SHAM a los 21 días, observamos que el área del defecto disminuyó en algunos especímenes y en otros parece aumentada; más allá del tamaño, el área central del defecto se continuó observando rellena por tejido conectivo laxo, en algunas áreas a la periferia del defecto se observó formación de un tejido con forma y estructura similar a la de la matriz osteoide y en los bordes del hueso preexistente se observaron osteoblastos.

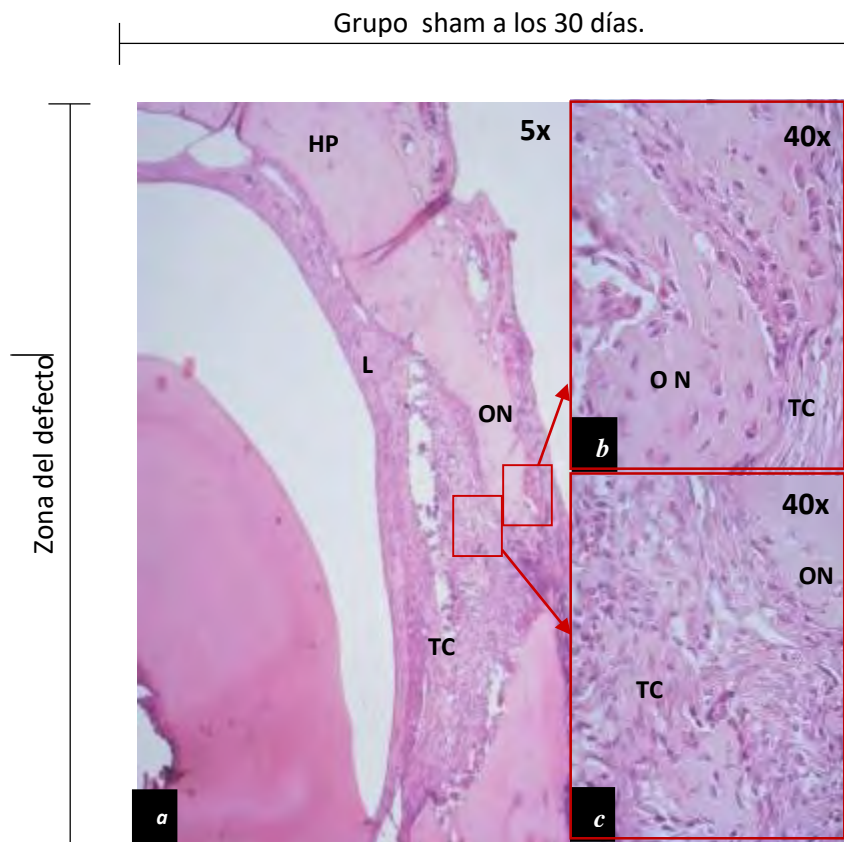


Figura 26. Fotografía en microscopía óptica con tinción H-E del grupo sham a los 30 días, a) muestra un corte de la zona del defecto a 5x, b) Acercamiento a zona de interés a 40x c) Acercamiento a zona de interés a 40x. D-dentina, L-ligamento periodontal, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, VS-vaso sanguíneo, ON-tejido óseo nuevo.

Después de observar las muestras del grupo SHAM a 30 días, de manera general podemos decir que: el área del defecto disminuye, incluso en dos de los especímenes se observó continuidad de hueso nuevo desde el hueso preexistente en los bordes del defecto hasta el centro, cabe mencionar que esta regeneración se observa con una distancia en profundidad menor de lo que había de hueso antes de realizar el defecto. En mayores aumentos observamos áreas en remodelación.

IX.III.II.-Resultados Histológicos del grupo PLA.

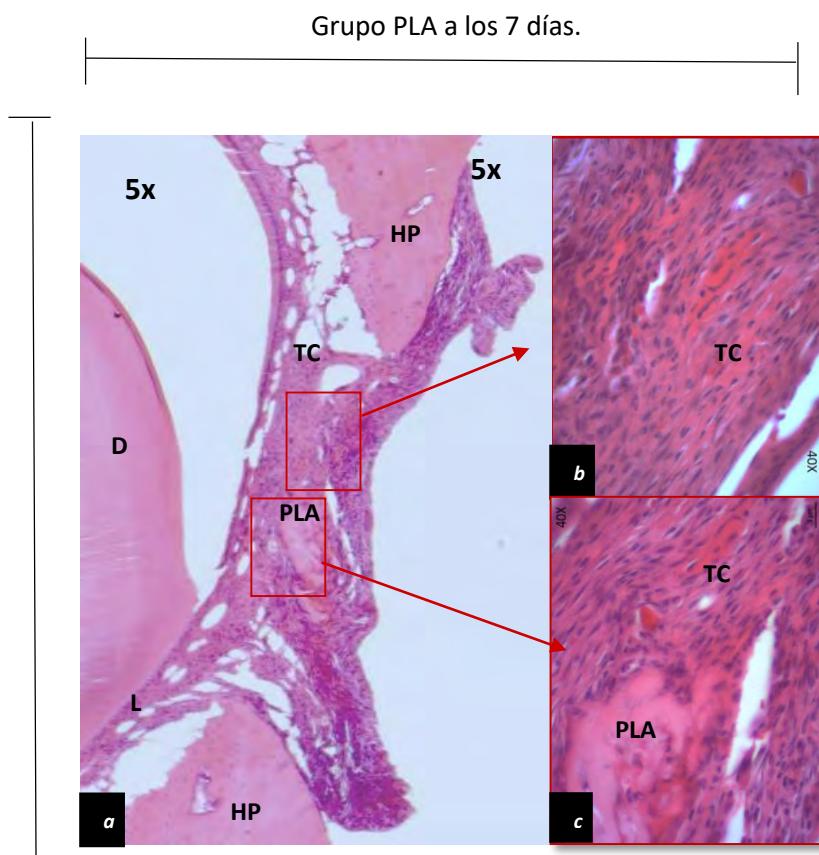


Figura 27 Fotografía en microscopía óptica con tinción H-E del grupo PLA a 7 días, a) muestra una imagen panorámica a un aumento de 5x b) Acercamiento a zona de interés a 40x, c) Acercamiento a zona de interés a 40x. D-dentina, L-ligamento periodontal, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo.

En las imágenes tomadas por microscopía óptica del grupo PLA a los 7 días, se observa tejido conectivo con numerosas células y la presencia de la membrana de PLA en el centro del defecto es evidente y alrededor de ella hay infiltrado inflamatorio y tejido conectivo celular. En los bordes se observa el hueso sano preexistente de apariencia normal.

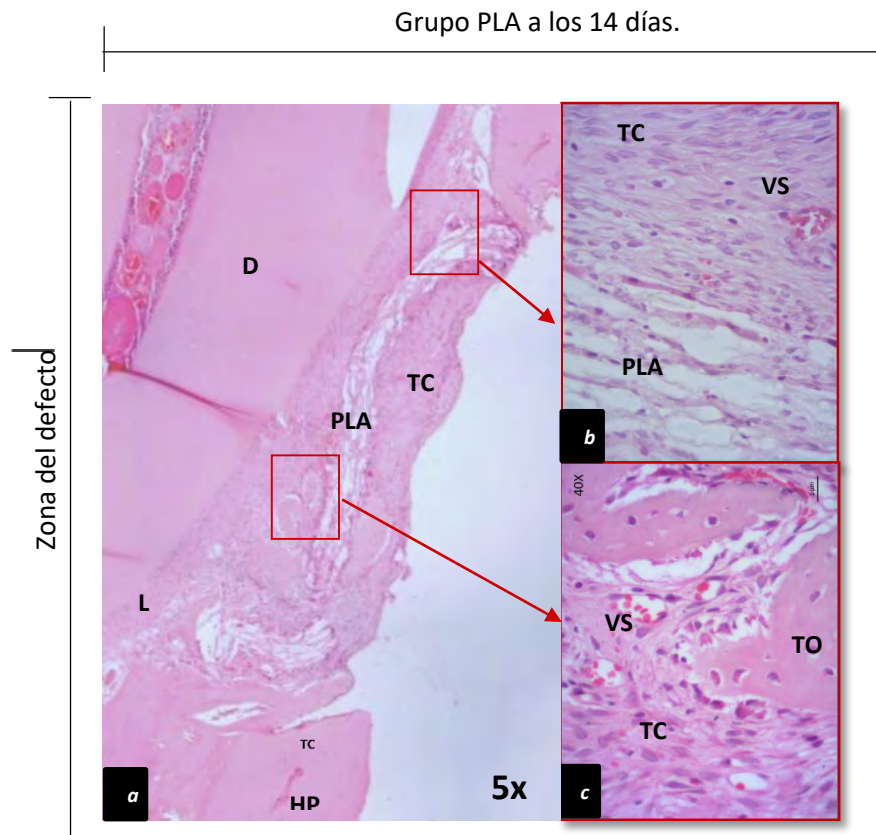


Figura 28 Fotografía en microscopía óptica con tinción H-E del grupo PLA a 14 días, a) muestra una imagen panorámica a un aumento de 5x b) Acercamiento a zona de interés a 40x c) Acercamiento a zona de interés a 40x. D-dentina, L-ligamento periodontal, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, VS-vaso sanguíneo.

En las muestras histológicas observadas mediante microscopía óptica del grupo PLA a los 14 días, observamos el área del defecto rellena por tejido conectivo y por la membrana de PLA. El infiltrado inflamatorio visto al día 7 ya no se observa y la membrana está rodeada por células y por nuevos vasos sanguíneos, se observan también zonas con matriz probablemente en proceso de neo-mineralización y células osteoprogenitoras en el hueso preexistente de los bordes del defecto.

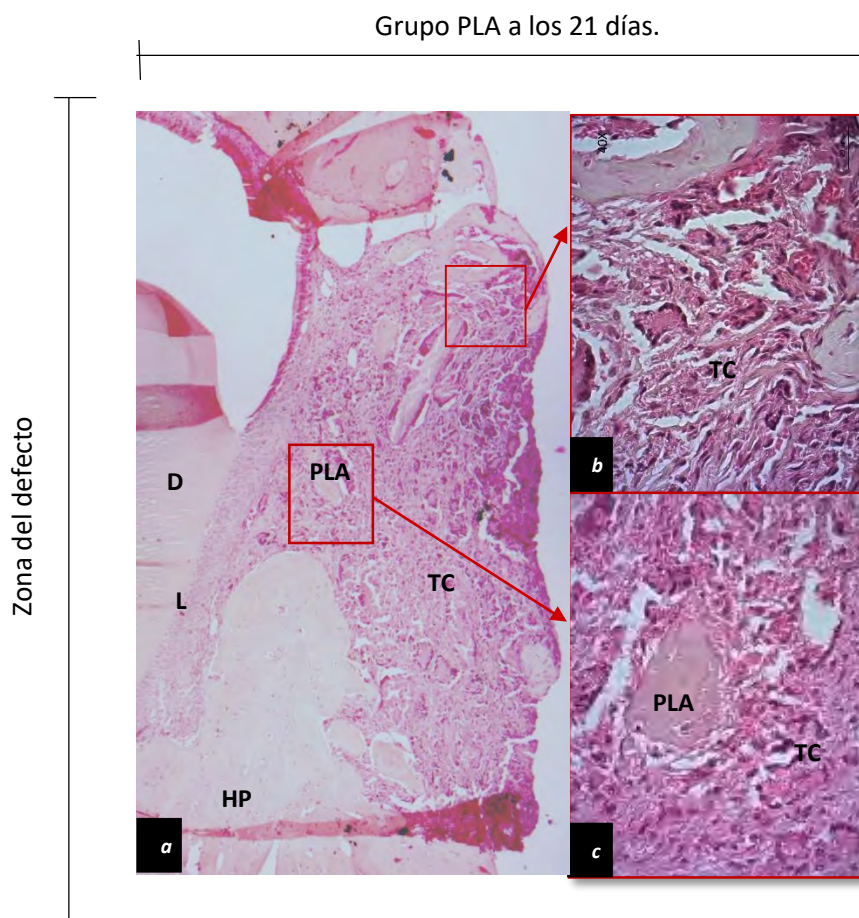


Figura 29. Fotografía en microscopía óptica con tinción H-E del grupo experimental a 21 días, a) muestra una imagen panorámica a un aumento de 5x b) Acercamiento a zona de interés a 40x c) Acercamiento a zona de interés a 40x. D-dentina, L-ligamento periodontal, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, VS-vaso sanguíneo, ON-tejido óseo nuevo.

En las muestras histológicas observadas mediante microscopía óptica del grupo PLA a los 21 días, observamos que el área del defecto disminuyó es evidente la formación de hueso nuevo de los bordes y al centro del defecto. En las observaciones realizadas a mayores aumentos el área de la periferia se ve rodeada de células osteoprogenitoras. La membrana de PLA aún se puede observar en la zona del defecto.

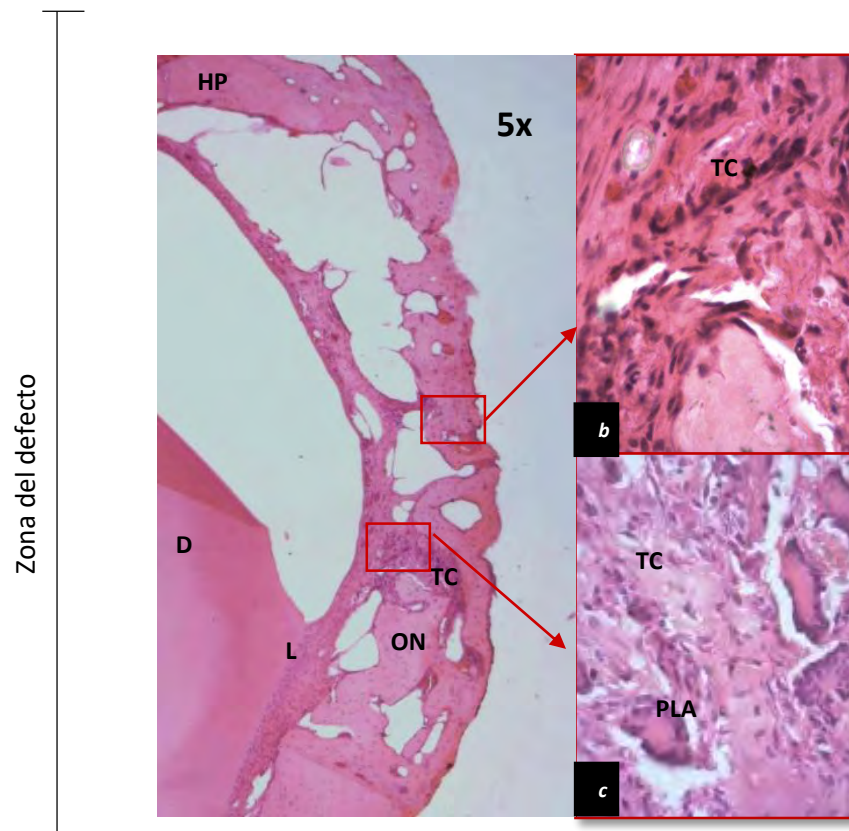


Figura 30. Fotografía en microscopía óptica con tinción H-E del grupo PLA 30 días, a) muestra una imagen panorámica a un aumento de 5x; b) Acercamiento a zona de interés a 40x. c) Acercamiento a zona de interés a 40x. D-dentina, L-ligamento periodontal, HP-hueso preexistente, TC-Tejido conectivo, VS-vaso sanguíneo, ON-tejido óseo nuevo.

Después de observar las muestras del grupo PLA 30 días, podemos pensar que la membrana de PLA mejoro la regeneración de hueso en el área del defecto ya que el defecto cerró, se observan centros de remodelación y formación de trabéculas óseas que le darán al hueso el grosor del hueso intacto. Cabe menciona que aunque en algunos de los cortes no se observa claramente la membrana aún se encuentra en el hueso y que la degradación que se observa del PLA no afecta a los tejidos circundantes.

X.-DISCUSIÓN.

Existen múltiples maneras de producir PLA, pero ninguna de estas se puede considerar fácil de ejecutar, ya que la síntesis de PLA requiere un control riguroso condiciones como: temperatura, presión y pH, el uso de catalizadores y tiempos de polimerización que implica un alto consumo de energía. Entre los métodos tradicionales de fabricación de andamios con polímeros utilizados en la IT existen algunos tales como: fundición con disolvente, lixiviación de partículas, espuma de gas, separación de fases, el electrohilado y la impresión 3D (Wang, 2016). El electrohilado ofrece como principales ventajas que proporciona al biomaterial alta flexibilidad, fibras manométricas, alta porosidad, poros interconectados y es un método económico y eficiente (Leach, 211) (Sánchez, 2013).

En esta tesis inicialmente probamos dos biomateriales, hechos por electrohilado: uno de PLA al 6% y otro de PLA al 10% En los estudios *in vitro* pudimos observar que las células toleraron ambos biomateriales, lo que era de esperarse, pues según estudios previos el PLA es un material compatible y bien tolerado por los tejidos; Lou T y colaboradores en el 2013, realizaron ensayos *in vitro* de un biomaterial PLA con microfibras de quitosano (PLLA/ MCTSF) con fibroblastos en los días 3, 5 y 8. Observaron proliferación de células en los andamios compuestos con una tendencia creciente significativa ya que, el tiempo de duplicación de las células fue de alrededor de 2- 3 días (Lou, 2013), sin embargo, no muestran los resultados usando el PLA solo, nosotros observamos en nuestras pruebas *in vitro* que la viabilidad celular aumento al doble a las 48 horas y al tercer día esta se había triplicado en los biomateriales al 6% y cuádruplicado en los del 10%, además, enriquecimos estos resultados con la Microscopia óptica de barrido, que nos mostró claramente que el biomaterial al 10% era nuestro candidato para usar en los experimentos *in vivo*.

El procedimiento que utilizamos para esterilizar el biomaterial mediante UV demostró ser útil ya que nuestros andamios no se deformaron ni sufrieron contaminaciones durante en la fase *in vitro*. En la fase *in vivo* solo un espécimen presentó un proceso de infección (fue descartado del estudio) y atribuimos este hecho, más al medio ambiente quirúrgico que al biomaterial, el

UV mantuvo las propiedades físicas y mecánicas del andamio, ya que no se deforma (Dargaville, 2013).


Como observamos en los antecedentes de esta tesis, los modelos más empleados para probar la regeneración ósea en el área de la IT son realizados en huesos largos como el caso del fémur y el radio (Rimondini, 2005), sin embargo, el hecho de usar aquí un modelo en mandíbula pone a prueba las capacidades distintas del biomaterial en las que la principal no es el soporte mecánico, sino las propiedades osteoconductoras del biomaterial, pues el área donde realizamos nuestros defectos en el modelo experimental es en hueso cortical, que entre otras diferencias presenta una vascularidad pobre (Ramírez, 2015).

Nuestro modelo permite a los especímenes continuar con su alimentación habitual, incluso a pocas horas de la intervención quirúrgica, lo que evita que el estado sistémico y de nutrición de los especímenes pueda ser un factor que intervenga cuando realizamos el implante de la membrana de PLA al 10%. Decidimos emplear especímenes machos a fin de evitar sesgos, ya que se reportó que las hembras presentan una cicatrización ósea menor y así, evitamos, los probables cambios en la regeneración derivados de los cambios hormonales que se encuentran en las hembras (Strube, 2009) (Weitzman, 2006).

El tamaño y la forma del defecto óseo que realizamos en la mandíbula en la presente tesis, no solo es menos traumático, sino que además permite mantener un soporte óseo en donde implantamos los biomateriales de PLA al 10% como relleno, lo que nos permitió observar sus propiedades osteoconductoras, como ya se ha mencionado, más allá de las biomecánicas.

Hemos comprobado una vez más, que el PLA resultó biocompatible en nuestro estudio, ya que en nuestros hallazgos histológicos no observamos una respuesta de reacción a cuerpo extraño, no observamos anomalías en los tejidos periimplantares (López, 2016), no observamos la presencia de células con morfología de células gigantes de cuerpo extraño, tampoco mastocitos ni macrófagos ni osteoclastos, ni se observó formación de cápsula fibrosa alrededor del biomaterial.

A pesar de que el ácido láctico es un subproducto no tóxico del cuerpo humano, grandes cantidades de éste en el organismo obtenidas por una rápida degradación del biomaterial de PLA podrían causar reacciones inflamatorias agudas (Lou, 2013); por lo que la lenta degradación que



hemos observado en nuestro biomaterial de PLA consideramos que es favorable a los procesos de regeneración de hueso. Smeets R y colaboradores en su estudio con andamios compuestos de PLA y β - fosfato tricálcico que implantaron en defectos críticos en ratas demostraron que a los 30 días esos defectos fueron rellenados por tejido óseo regenerado, lo que indica que el biomaterial de PLA colaboró en este cambio del biomaterial por tejido nuevo mostrando una tasa adecuada de reabsorción, de manera similar a lo que nosotros observamos en nuestros especímenes a los 30 días.

Respecto a la osteoinducción que encontramos definida por Alfaro J como: “el proceso por el que se facilita la formación de tejido óseo nuevo sobre un material que funciona como “andamiaje” y facilita el proceso de orientación de los nuevos vasos sanguíneos y hueso nuevo” (Alfaro, 2011) y como .Como menciona Sahar en su trabajo: “la presencia de cualquier célula viva en un andamio puede ayudar en la formación de una red vascular”, lo que creemos que pudo haber contribuido a la regeneración en nuestros defectos óseos (Sahar, 2012).

Durante las pruebas *in vitro* específicamente en MEB observamos numerosas células adheridas en interior y alrededor del andamio, y en las pruebas *in vivo* histológicamente células fueron observadas alrededor y dentro del biomaterial lo que se corresponde claramente con la propiedad de osteoinducción.

PERSPECTIVAS

En la IT de tejido óseo requiere de biomateriales que puedan ser empleados como andamios cumpliendo con el apoyo mecánico y el espacio interior necesario para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como la formación y crecimiento de tejido. Por ello, se ha dicho que el conjunto de todas estas características ideales en un biomaterial se denomina “diseño biomimético” (Wu, 2011) y éste incluye: la biocompatibilidad y bio-funcionalización, con el objetivo de mejorar funciones biológicas tales como: osteoconducción, osteoinducción, osteogénesis, osteointegración y el rendimiento antibacteriano para que el biomaterial sea capaz de soportar el sistema de regeneración de tejido óseo con una velocidad de degradación controlada; por lo que proponemos realizamos más estudios agregando al PLA al 10% alguna biomolécula de acción osteoinductora que mejore este proceso de regeneración.

XI.-CONCLUSIONES

Las pruebas preliminares *in vitro* de los biomateriales demostraron son biocompatibles, de ellos, en el PLA 10% observamos una mayor viabilidad celular, una estructura porosa más uniforme y adecuada para la adhesión celular.

Cuando el PLA al 10% fue implantado en los defectos óseos mandibulares en ratas, no causó reacciones inmunológicas, lo que nos indicó que los residuos derivados de este material no son tóxicos, la degradación observada fue lenta ya que, aún observamos rastros de PLA (histológicamente) en el grupo a 30 días. Además, mostró características de osteoconducción.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, tanto en las pruebas *in vitro* como en las pruebas *in vivo*, podemos concluir que las membranas de PLA al 10% empleadas en la presente tesis son biocompatibles, no tóxicas, osteoconductoras y su degradación permite la regeneración ósea en los defectos en los que fue implantado.

Trabajos citados

- Abarca, A. A. (2010). Applications of aloplastic materials in rhinoplasty. *Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, 259-264.
- Alfaro, J. J. (2011). Regeneración ósea. Biomateriales, sustitutos óseos y sustitutos del injerto óseo. *Biomateriales y sustitutos óseos en traumatología y cirugía ortopédica.*, 11-26.
- Andrades, J. A. (2011). Nanomaterials and hydrogel scaffolds for articular cartilage regeneration. *Tissue Engineering*, 301-305.
- Andrae, T. M. (22 de 01 de 2017). *SlideShare*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/colegiociencias/polimeros-sinteticos-8776708>
- Arboleya, L. S. (2013). Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *Reumatología Clínica*, 303-315.
- Badami, A. S. (2006). Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials*, 696-606.
- Bello, C. P. (2012). Respuesta histológica al uso de proteína morfogenética ósea tipo 2 (rhBMP-2) en defectos óseos provocados en ratas Wistar. *Rev Sanid Milit Mex*, 83-88.
- Cabrera, A. M. (2009). Traumatismo craneoencefálico severo. *Revista de la asociación mexicana de medicina critica y terapia intensiva*, 94-101.
- Carrillo Jorge, N. E. (2011). Cáncer oral en México. Revisión bibliográfica y presentación de caso clínico. *Colegio Mexicano de Cirugía BUcal y Maxilofacial A,C.*, 104-108.
- Carrillo, R. E. (2015). Trauma craneoencefálico. *Revista Mexicana de Anestesiología* , S433-S434.
- Dargaville, B. L.-W. (2013). Electrospinning and crosslinking of low-molecular-weight poly (trimethylene carbonate-co-l-lactide) as an elastomeric scaffold for vascular engineering. . *Acta biomaterialia*, 6885-6897.
- Decco, O. A. (2009). Guided Bone Regeneration With Microfixed PLA/PGA Membranes in an Experimental Model. *Exact and Naturales Sciencias*, 191-203.
- Ekin, O. C. (2016). Poly(L-Lactide)/Poly(ε-Caprolactone) and Collagen/β-Tricalcium Phosphate Scaffolds for the Treatment of Critical-Sized Rat Alveolar Defects: A Microtomographic, Molecular-Biological, and Histological Study. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 453-463.
- El economista. (12 de Mayo de 2013). 90% de mexicanos padecen gingivitis: ADM. *El economista*.
- Estrada, C. (2006). Ingeniería de tejido óseo : consideraciones basicas . *EIA*.
- Fawcett, B. (2011). *Compendio de histología*. México: Mc Graw Hill.
- Gartner, L. P. (2010). *Biología celular e histología*. Mwxico: Board Review Series.

- Giannoudis, P. E. (2007). Fracture healing: the diamond concept.
- Gómez Roberto, L. N. (2008). Incidencia de labio y paladar hendido en México:2003-2006. *Revista ADM*, 309-313.
- Gruber, R. W. (2009). Ectopic bone formation after implantation of a slow release system of polylactic acid and rhBMP-2. *Clinical oral implants research*, 24-30.
- Gyle, D. A.-C. (2017). A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *European Polymer Journal* , 373-392.
- Hing, K. A. (2004). Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philosophical Transactions of the Royal Society a Mathematical, Physical and engineering sciences*.
- Jie Yuan, M. P. (2012). Biomimetic Scaffolds: Implications for. *SCIENTIFIC FOUNDATION*, 294Y297.
- Jingfeng Li, L. J. (2015). Repair of rat cranial bone defect by using bone morphogenetic protein-2-related peptide combined with microspheres composed. *Biomed. Mater.*
- Joong, H. K.-J. (2013). A novel in vivo platform for studying alveolar bone regeneration in rat. *Journal of Tissue Engineering*.
- Junqué, C. (1999). Secuelas neuropsicológicas de los traumatismos craneoencefálicos. *REV NEUROL*, 423-429.
- Leach, M. K. (211). Electrospinning fundamentals: optimizing solution and apparatus parameters. *Journal of Visualized Experiments*, e2494-e2494.
- Li, Y. S.-K. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*, 95-104.
- Linero, S. I. (2012). REGENERACION OSEA POR IMPLANTE DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO EN UN MODELO ANIMAL. *Tesis doctoral*, 1-108.
- Lopes, M. S. (2014). Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications. *Chemical Engineering Transactions*,, 331-336.
- López, C. M.-C. (2016). Reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño secundaria a biomateriales y su respuesta inmunológica: Revisión sistemática de la literatura. *Salutem Scientia Spiritus*.
- Lou, T. W. (2013). Fabrication of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffold reinforced by surface modified chitosan micro-fiber. *International journal of biological macromolecules*, 353-358.
- Lung, T. T. (2007). Head and neck cancer, epidemiology and histological aspects - Part 1: a decade's results 1993-2002. *Journal Craniomaxillofac Surg*, 120-125.
- Marcelly, L. S. (2012). REGENERACION OSEA POR IMPLANTE DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO EN UN MODELO ANIMAL. Colombia : Universidad nacional de colombia .
- Mladina, R. S. (2008). Unilateral cleft lip/palate children: the incidence of type 6 septal deformities in their parents. *J Craniomaxillofac Surg*, 335-340.

- Moreno, V. C. (2015). *Proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2): producción y evaluación de su actividad osteoinductora in vitro e in vivo*. Madrid: Tesis doctoral.
- Muschler, G. &. (2002). Connetive tissue progenitors: practical concepts for Clinical Applications. *Clinical Orthopaedic*, 395, 66-80.
- Ontiveros, Á. A.-C.-E. (2014). Factores pronósticos de recuperación y reinserción laboral en adultos con traumatismo craneoencefálico. *Revista Mexicana Neurociencia*, 211-217.
- Ostafinska, A. I. (2017). Strong synergistic effects in PLA/PCL blends: Impact of PLA matrix viscosity. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 229-241.
- Peral, C. B. (2008). Experimental study in rats of mandibular bone regeneration. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*, 313-323.
- Ramírez, M. (2015). *Validación de defecto crítico en hueso mandibular de rata*. México.
- Rezwan K, C. Q. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 3413–3431.
- Riaño, V. J. (2012). *Matriz tridimensional con potencial para regeneración ósea*. Colombia.
- Rimondini, L. (2005). In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*.
- Rivasplata, C. A. (29/05/2017 de mayo de 2017). *sideshare*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/traumatologo2012/fisiopatologa-stress-rivasplata>
- Ross, P. (2008). *Histología, Texto y atlas color con biología celular y molecular*. Mexico: Panamericana.
- Sahar, D. E. (2012). Effect of endothelial differentiated adipose-derived stem cells on vascularity and osteogenesis in poly(D,L-lactide) scaffolds in vivo. *Journal of Craniofacial Surgery*, 913-918.
- Sánchez, L. M. (2013). Electrospinning: la era de las nanofibras. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10-27.
- Savioli, L. M. (2012). Poly (lactic acid) production for tissue engineering. *Procedia Engineering*, 1402-1413.
- Secretaría de Salud. (15 de Enero de 2017). *Sistema Nacional de vigilancia epidemiológica* . Obtenido de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2010/sem10.pdf>
- Serna, L. (2003). Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *ingeniería y compatitividad*.
- Shady Farah, ,. D. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 367–392.
- Smeets, R. B. (2016). Selective laser-melted fully biodegradable scaffold composed of poly(d,l-lactide) and β -tricalcium phosphate with potential as a biodegradable implant for complex maxillofacial reconstruction: In vitro and in vivo results. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*.
- Stevens, A. S. (2007). *Histología Humana*. (H. Brace, Trad.) México: Elsevier Mosby.

- Strube, P. M. (2009). Sexspecific compromised bone healing in famel rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone*, 1065-72.
- Tajbakhsh, S. a. (2017). A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, 897-912.
- Tollemar, V. Z. (2016). Stem cells, growth factors and scaffolds incraniofacial regenerative medicine. *Genes & Diseases*, 56-71.
- Tosounidisa, T. G. (2009). Fracture healing and bone repair: an update. *Trauma*, 145-156.
- Triplett, R. G. (2017). New frontiers in biomaterials . *Oral Maxillofacial Surg Clin NAm*, 105-115.
- Vert M, L. S. (1992). Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Mater Sci Mater Med*, 432-46.
- Wang, M. P. (2016). Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 256-265.
- Weitzman, M. P. (2006). Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest*, 94-186.
- Wu, S. L. (2011). Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, 80, 1-36.
- Xiao LI, W. B. (2011). Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials:Synthesis, Modification and Applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*.
- Xiaojun, X. J. (2014). Bone Morphogenetic Protein-2-Encapsulated Grafted-Poly-Lactic Nanoparticles Promote Bone Repair. *Springer Science+Business Media New York*, 215–225.
- Xu, W. H. (2016). Estrogen enhances the bone regeneration potential of periodontal ligament stem cells derived from osteoporotic rats and seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly (L-lactide). *International journal of molecular medicine*, 1475-1486.
- Yao, Q. J. (2017). Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffoldswith significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formationcranial bone formation. *Biomaterials*, 115-127.