



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA
INDUCIDA POR ANDAMIOS DE PLA CON
HIDROXIAPATITA.
PROPUESTA PARA TRATAMIENTO
PREPROTÉSICO.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MARÍA FERNANDA OVIEDO LÓPEZ

TUTORA: Dra. JANETH SERRANO BELLO

ASESOR: Dr. EDUARDO VILLARREAL RAMÍREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas, sin las cuales no habría sido capaz de terminar mi carrera profesional y de realizar este trabajo de investigación:

A mi mamá por el apoyo que me ha dado a lo largo de estos años, por toda su paciencia, trabajo, incansable dedicación, por su ánimo y su gran amor que me impulsaron a comenzar, continuar y finalizar con este gran proyecto de vida.

A mis hermanos, Richo y Lupita, por no dejar de creer en mí y siempre darme un motivo nuevo para continuar luchado.

A la Dra. Janeth Serrano Bello por la dirección de este trabajo de investigación, por su dedicación, motivación, por su gran pasión por la investigación y por compartirme parte de su conocimiento, en ella encontré a una gran maestra y un excelente ser humano.

Al Dr. Eduardo Villarreal Ramírez por todo el apoyo que nos brindó a lo largo de la realización de este trabajo.

A todo el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la unidad de Posgrado de Odontología de la UNAM, por su calurosa acogida y por su ayuda en las diferentes etapas de este proyecto.

A la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, en particular al Dr. Enrique Pinzón Estrada, jefe de la misma, al M.V.Z. Ismael Torres Saldaña y al M.V.Z. Víctor Manuel Salgado Alfaro por su apoyo técnico en el cuidado y manejo de los animales de laboratorio, de la misma manera a la Unidad de Bioterio (DEPeI) FO UNAM, en especial al Sr. Juan Manuel Trejo Ramírez.

Al personal del área de “Micropet” en especial al Dr. Luis Alberto Medina Velázquez del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) por su conocimiento, toda su ayuda y paciencia en las sesiones de microtomografías; sin ustedes no habríamos logrado tomar esas muestras.

Al M. en C. Manuel Aguilar Franco del área de Microscopia del Instituto de Física de la UNAM por su paciencia, su apoyo y todas las horas extra que paso ayudándonos en la toma y procesamiento de las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido.

Al Maestro José Arturo Fernández Pedrero por el apoyo en la adquisición de consumibles para el bioterio como cajas para los roedores, bebederos, alimento y equipo quirúrgico; sin su apoyo este trabajo sería imposible.

Al proyecto UNAM-PAPIIT-DGAPA IA207216 por el apoyo recibido para la realización del proyecto.

A mis amigas; Alma, Cori, Fani, Luz, Danimon, Vicky, Isamar, Ari, Angie, May y Anita por todos estos años apoyándome y haciéndome reír, por todo lo que hemos aprendido y por todo lo que nos falta por vivir, por nunca dejarme olvidar que:

“Hay tantas cosas que se puede complicar, pero antes muerto que dejar de soñar” Kilómetros- Los Caligaris.

Y a Daniel, por ser mi sol siempre, por creer en mí, por enseñarme tantas cosas, por estar a mi lado en todo momento, por todo la ayuda que me dio en la realización de este trabajo y “por ser mi amor, mi cómplice y todo”.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN.....	5
II ANTECEDENTES.....	7
2.1 REHABILITACIÓN PROTESICA CON IMPLANTES DENTALES.....	7
2.2 TRATAMIENTO PREPROTÉSICO.....	10
2.3 HUESO.....	11
2.3.1 Composición y tipos de hueso.....	11
2.3.2 Defectos óseos.....	15
2.4 OSTEOGÉNESIS: REGENERACIÓN ÓSEA.....	18
2.5 ANDAMIOS.....	26
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	32
IV HIPÓTESIS.....	33
V OBJETIVOS.....	34
5.1 Objetivo general.....	34
5.2 Objetivos específicos	34
VI METODOLOGÍA	35
VII RESULTADOS.....	40
VIII DISCUSIÓN.....	53
IX CONCLUSIONES.....	56
X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

I INTRODUCCIÓN

La prótesis dental es el área de la odontología que se encarga de devolver la función y la estética mediante el uso de prótesis dental, buscando siempre una adecuada oclusión y una función correcta.

Para poder obtener una adecuada rehabilitación protésica mediante el uso de implantes dentales o cualquier otra modalidad de la prótesis se debe contar con un estado de salud óptimo tanto en los dientes como en el periodonto.

En boca, los defectos de tamaño crítico en hueso maxilar o mandibular pueden ser causados por enfermedad periodontal, agentes mecánicos como prótesis desajustadas, defectos congénitos o traumas, estos se vuelven un gran reto terapéutico y actualmente el número de pacientes afectados ha ido en aumento, por lo que se han buscado nuevas opciones funcionales para que el tratamiento sea exitoso.

La bioingeniería de tejidos se crea como respuesta a las complicaciones que se generan cuando se busca reparar o regenerar los tejidos. En Odontología los nuevos avances en el área de investigación en la ingeniería de tejidos se enfocan en los biomateriales que se pueden usar para formar membranas o andamios que combinados con factores de crecimiento, células o demás compuestos sirvan en la reconstrucción, reparación y remplazo del hueso dañado.

Actualmente en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la unidad de Posgrado de Odontología de la UNAM, uno de los objetivos que se tiene es encontrar un material de uso odontológico predecible para ser utilizado como inductor en la regeneración ósea, y una de las estructuras que se están investigando son los andamios

fabricados con ácido poliláctico (PLA) ya que por sus cualidades es uno de los materiales de elección para utilizarse en la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico.

La hidroxiapatita (HA) es uno de los minerales encontrados abundantemente en la matriz ósea y posee una alta biocompatibilidad con las células humanas dando así sitios activos para la bio mineralización y adhesión celular

Al combinar un andamio de ácido poliláctico con Ha se logra crear una estructura que posee propiedades de osteoconducción, oseointegración y osteoinducción.

En esta investigación se evaluó la regeneración ósea utilizando andamios de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% previamente cultivados con osteoblastos, los cuales fueron colocados en defectos de tamaño crítico en la calvaria de ratas cepa *Wistar*.

II ANTECEDENTES

2.1 REHABILITACIÓN PROTÉSICA CON IMPLANTES DENTALES

A lo largo de la historia, el hombre se ha preocupado por conservar y mejorar la estética de sus dientes a través de diferentes técnicas; una de las más importantes ha sido el uso de prótesis dental.

Debido a que los dientes han tenido una gran importancia tanto en la alimentación como en el ámbito fonético y social desde la antigüedad, constantemente se actualizan las técnicas que se utilizan para poder mantener o devolver el estado de salud a estos, así como a los tejidos adyacentes con la finalidad de obtener una correcta rehabilitación y mejorar la calidad de vida de los pacientes¹.

La rehabilitación protésica usualmente requiere del trabajo colectivo de diferentes especialidades para realizar un tratamiento integral de calidad y con un excelente pronóstico, ya que la finalidad de las diferentes áreas odontológicas es tener equilibrio y funcionamiento en todas las estructuras que conforman la cavidad oral, y se habla de un tratamiento integral porque al momento de rehabilitar a un paciente con cualquier tipo de prótesis, ya debió pasar por una evaluación previa que incluye desde tratamientos de endodoncia hasta el tratamiento de los tejidos periodontales, buscando con esto tener un estado óptimo no solo de los dientes sino también de los tejidos de soporte.

Actualmente el campo de la rehabilitación protésica nos permite desarrollar diferentes ámbitos odontológicos que no solo se

relacionan con el objetivo principal de esta área médica que es devolver la función a la cavidad oral; sino que gracias a todos los avances tecnológicos y a la investigación de diferentes materiales, ya podemos no solo identificar las diferentes necesidades e inquietudes de los pacientes sino actuar para poder satisfacer la mayoría de ellas, rehabilitando de forma funcional y estética, así como de forma duradera.

Cuando buscamos rehabilitar de forma multidisciplinaria tenemos que llevar el proceso correcto, ya que este es un factor importante para poder determinar el diagnóstico y el tratamiento que se realizará, y de no seguir el orden adecuado la rehabilitación podría fracasar o complicarse².

La conservación de los dientes naturales ha tenido especial interés en las últimas décadas, volviéndose más frecuente el rechazo a las extracciones dentales y abriendo camino a las nuevas tecnologías y procedimientos que buscan conservarlos y rehabilitar de forma más estética y duradera la ausencia de estos, logrando una mayor satisfacción en los pacientes.

Dentro de este tema podemos hablar de materiales y sistemas que han ganado terreno en los últimos años como son la Zirconia, el Disilicato de Litio, sistemas como el CAD CAM que facilita tanto el diseño como la elaboración de la prótesis dental dando mejores resultados, así como el surgimiento de los implantes dentales¹.

Los implantes dentales son objetos ajenos al organismo humano que se alojan en el tejido óseo de mandíbula o maxilar con la finalidad de sustituir a los dientes ausentes.

Con el paso de los años, los avances tecnológicos, los nuevos descubrimientos biológicos y las necesidades cambiantes de los pacientes han provocado que el número de personas que prefieren un tratamiento con implantes sea cada vez mayor, ampliando las posibilidades de la rehabilitación protésica.

Se debe tener en cuenta que el éxito de un implante recae principalmente en la oseointegración, ya que si esta parte es exitosa podremos tener mayor probabilidad de un buen funcionamiento, estética, calidad y larga duración ¹.

En los años 60's el Dr. Brånemark y sus colaboradores enfocaron parte de sus estudios en procesos biológicos tales como evaluar la circulación del hueso y los posibles problemas de cicatrización de las heridas al momento de introducir un cuerpo extraño en los tejidos vivos; uno de sus mayores descubrimientos, y que serviría como impulso para el desarrollo de la implantología, fue que después de colocar titanio en hueso con una técnica poco invasiva se lograba que el metal se uniera al hueso de una forma íntima y firme, lo que se conoce como oseointegración, y lo que significaba que al relacionarse de esa forma podría utilizarse como un soporte al momento de explorar los diversos tratamientos de rehabilitación protésica ¹.

Otras de las consideraciones que se deben tener en cuenta cuando se busca una rehabilitación protésica mediante implantes es que no solo se busca reemplazar un diente ausente, sino también aumentar la estabilidad primaria, el mantenimiento de la cresta ósea marginal y, en caso de que se presente, mejorar la adaptación a defectos anatómicos y alveolos post extracción ³.

Antes de que se logre la oseointegración, se debe lograr la estabilidad primaria del implante, que es la resistencia y la rigidez que se da cuando se unen el hueso y el implante evitando el micro movimiento inicial que se puede dar en la interfaz de esta unión, dependiendo principalmente de la forma del implante, la técnica quirúrgica que se utilice, la densidad y dureza del sitio receptor.

La estabilidad secundaria es lo que se logra cuando se suman la estabilidad primaria y la estabilidad que se logra gracias a la aposición ósea de la cicatrización.

Es de vital importancia que el estado de salud del hueso receptor sea el mejor, ya que de esta forma se da un mejor pronóstico tanto para el implante como para la posterior rehabilitación protésica ³.

Hablar de la calidad de hueso en implantología es primordial debido a que nos indica si el tratamiento es viable y de qué forma se debe proceder a la hora de la colocación de los implantes, así como de estimar un tiempo aproximado de cicatrización.

Tomando en cuenta esto, junto con el tipo de implante y la técnica de colocación que se utilizará, podemos predecir el éxito o fracaso del tratamiento y, en caso de necesitarse, determinar si para mejorar la calidad del hueso receptor del implante se puede utilizar alguna técnica que sea capaz de inducir la formación de tejido mineralizado nuevo. ⁴

2.2 TRATAMIENTO PREPROTÉSICO

Cuando existe pérdida de dientes naturales o enfermedad periodontal se dan cambios en la estructura del hueso de maxilar y mandíbula ya que no cuenta con dientes y ligamento periodontal

para transmitir y distribuir las fuerzas oclusales, generando reabsorción ósea ⁵.

En algunos caso esta reabsorción puede estabilizarse después de un tiempo, pero en otros llega a ser crítica y lleva a la pérdida total del hueso alveolar, esta reabsorción se ve acelerada cuando los pacientes usan prótesis dentales, ya que la distribución de las fuerzas de oclusión no son favorables; por otro lado cuando hablamos de realizar extracciones dentales, se tiene que considerar tanto el valor protésico como la técnica utilizada, para evitar dejar espículas óseas, fractura de las corticales o una reabsorción mayor que se complicarían con el uso de una prótesis.

Estas precauciones se deben tener presentes al momento de realizar un plan de tratamiento ya que es parte de la preparación y conservación de los tejidos blandos y duros durante la preparación quirúrgica pre-protésica del paciente, cuyo objetivo principal es tener estructuras de soporte adecuadas para la posterior rehabilitación con prótesis dental fija, removible o para la colocación de implantes dentales.

La preparación preprotésica es parte del camino que se debe seguir para obtener una rehabilitación funcional y estética para el paciente, ya que un correcto manejo de los tejidos de soporte favorecen el pronóstico y la correcta rehabilitación, de igual manera realizar tanto la valoración como las intervenciones adecuadas para mejorar el estado de salud de los tejidos periodontales debe ser prioritario en esta fase, ya que muchas veces el tratamiento protésico fracasa por no tener un estado periodontal óptimo ⁵.

2.3 HUESO

2.3.1 Composición y tipos de hueso

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado que se encuentra vascularizado, innervado y está formado por laminillas calcificadas de matriz osteoide (Tabla 1) que son las que determinan, según su posición y distribución, si el hueso es cortical o esponjoso ⁶.

La conformación del tejido óseo se distribuye principalmente en dos fases: una fase orgánica y otra inorgánica o mineral.

La fase orgánica está conformada por una gran cantidad de colágeno tipo I, matriz ósea y células óseas (Tabla 2).

La fase inorgánica forma el 70% del tejido óseo y en su mayoría esta conformada por cristales de hidroxapatita que le dan la dureza, rigidez y resistencia al hueso, y del 5% al 8% restante es agua ⁶.

Tabla 1. Componentes de la Matriz Osteoide ⁷.

COLÁGENO	Tipo I, III, V, XII
PROTEOGLICANOS	<ul style="list-style-type: none">• Condroitin sulfato• Decorina• Biglicano• Hialuronano
PROTEÍNAS CON ÁCIDO - CARBOXI-GLUTÁMICO	<ul style="list-style-type: none">• Osteocalcina• Proteína de la matriz con ácido-Carboxi-glutámico
GLICOPROTEÍNAS	<ul style="list-style-type: none">• Osteonectina• Fosfatasa alcalina• Proteínas con RGD:<ul style="list-style-type: none">- fibronectina- trombospondina- osteopontina- vitronectina- sialoproteínas óseas
PROTEÍNAS DEL PLASMA	<ul style="list-style-type: none">• ALBÚMINA• α2-SH- glicoproteína

FACTORES DE CRECIMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> • IGF-I y II (Insulin growth factor I y II) • TGF-β (Transforming growth factor -beta) • PDGF (Platelet derived growth factor)
-------------------------	---

Tabla 2. Células óseas y sus funciones ⁷.

Osteoblastos	Derivadas de células pluripotenciales, son las células formadoras de hueso y sintetizan el componente orgánico de la matriz ósea: colágeno tipo I, proteínas no colágenas y factores de crecimiento.
Osteocito	Mantiene las propiedades biomecánicas del hueso
Osteoclasto	Mantiene la homeostasis ósea promoviendo la síntesis y reabsorción de hueso

El *hueso cortical* o *hueso compacto*, está estructurado principalmente por conductos de Havers cubiertos de forma concéntrica por laminillas de matriz osteoide, que a su vez reciben a los osteocitos, y que contienen en su interior capilares, vasos linfáticos fibras nerviosas y tejido conectivo (Fig. 1).

Se forma por una masa compacta cuatro veces mayor a la que tiene el hueso esponjoso, está rodeado externamente por el periostio y, cubriendo el espacio medular, internamente se encuentra el endostio⁸.

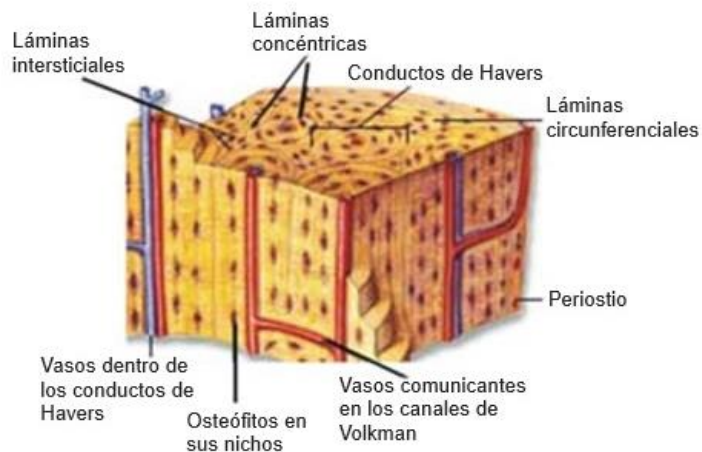


Fig. 1 Estructuras que forman el Hueso Compacto

El *hueso esponjoso* o también llamado *trabecular*, está formado por laminillas óseas dispuestas en forma de red delimitando cavidades areolares en cuyo interior se encuentra la médula ósea (Fig. 2)⁷.

La unidad básica de este tejido es la *osteona trabecular*, cuyo espesor dependerá del lugar donde se localice.

Cuando la trabécula es ancha significa que tiene varias osteonas en su composición dándole una mayor elasticidad; por el contrario, cuando una trabécula es delgada significa que solo posee una osteona en su composición ⁸.

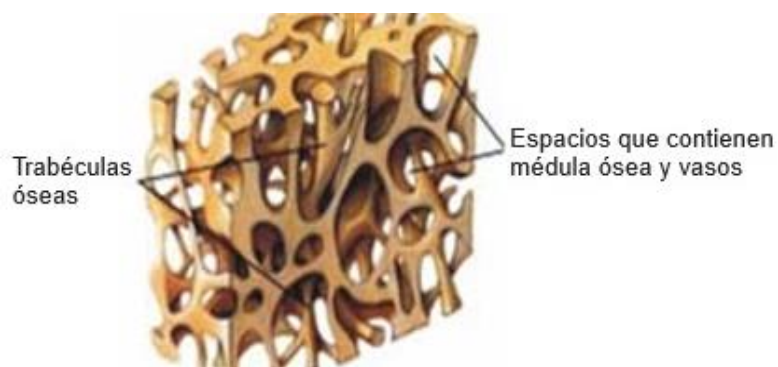


Fig. 2 Conformación del hueso esponjoso.

Dentro de los tejidos del organismo el hueso es el único capaz de regenerarse, es decir, después de que se produce una lesión traumática y tras un proceso de remodelado es capaz de formar hueso nuevo igual al preexistente. Siendo el hueso un tejido en constante reabsorción y formación se dice que es dinámico lo que permite que se mantenga la densidad ósea, la reparación del daño tisular y el control de los niveles de calcio en el organismo; gracias a esto al año y en condiciones normales se puede renovar un 5% del hueso cortical y hasta un 20% de hueso trabecular ⁹.

2.3.2 Defectos óseos

La pérdida de soporte óseo alveolar es uno de los signos característicos de la enfermedad periodontal, la extensión y severidad de esta pérdida determina el grado de enfermedad que existe; por lo que la generación de una lesión ósea es el resultado de la evolución en la enfermedad periodontal.

Gracias a que el hueso cuenta con la característica de ser dinámico, se puede estimular la capacidad de reparación y de remodelación, logrando con esto la ausencia casi completa de una cicatriz en este tejido. A pesar de esta característica, en algunas ocasiones existen defectos óseos en los que no se presenta la remodelación espontánea y debido a que el hueso se repara más lento que otros tejidos, necesitan factores externos que funcionen como materiales de reconstrucción y logren estimular la reparación ósea ⁹.

Dentro de los diferentes procedimientos que constituyen una rehabilitación en mandíbula o maxilar, se incluyen el uso de injertos para poder reconstruir defectos o deformidades congénitas o adquiridas.

Según el tipo y la forma del defecto existente se seleccionará el tipo de injerto que se use, ya que de esta forma se puede planear un mejor posicionamiento del injerto y mejorar el pronóstico del tratamiento.

Dentro de la clasificación de los defectos óseos encontramos que los defectos de tamaño crítico son aquellos donde el organismo no es

capaz de conseguir la reparación del tejido óseo promoviendo la formación de tejido de cicatrización, considerando a los defectos iguales o superiores a los 8mm de diámetro mayor como defectos de tipo crítico.

Los defectos no críticos son aquellos en donde el organismo es capaz de estimular la reparación ósea integral sin la necesidad de ayudarse de métodos externos ¹⁰.

La extensión del defecto óseo tiene gran relevancia en cómo se reparará este mismo, dando un mejor pronóstico a aquellos defectos intraóseos que tienen una extensión vertical ¹¹.

Los defectos óseos se dividen de acuerdo con la extensión que presentan, en 1958 Goldman y Cohen (Fig. 3) los clasificaron como:

- DEFECTOS SUPRAÓSEOS U HORIZONTALES: Son los defectos donde la base de este se localiza coronalmente a la cresta alveolar subyacente y la altura del hueso se reduce de forma horizontal ¹¹.
- DEFECTOS INTRAÓSEOS: Son los defectos donde la base está de forma apical a la cresta alveolar residual adyacente, dando como resultado una pérdida vertical de hueso y a su vez pueden dividirse de acuerdo con el número de paredes que lo conforman:
 - ➔ Defecto de 3 paredes: es aquel defecto intraóseo que se encuentra rodeado por tres paredes de hueso, tomando a la superficie radicular como una cuarta pared. Este es el defecto con mejor pronóstico ¹¹.

- ➔ Defecto de 2 paredes: es el defecto más común de todos y se sitúa principalmente en la zona interdental, tomando como paredes remanentes la pared lingual/palatina y la raíz del diente ¹¹.
- ➔ Defecto de 1 pared: suele estar presente en la zona interdental, teniendo como única pared presente la superficie del diente ¹¹.
- ➔ Defecto circunferencial: es aquel defecto que se da cuando existe una pérdida de hueso alrededor de todo el diente ¹¹.

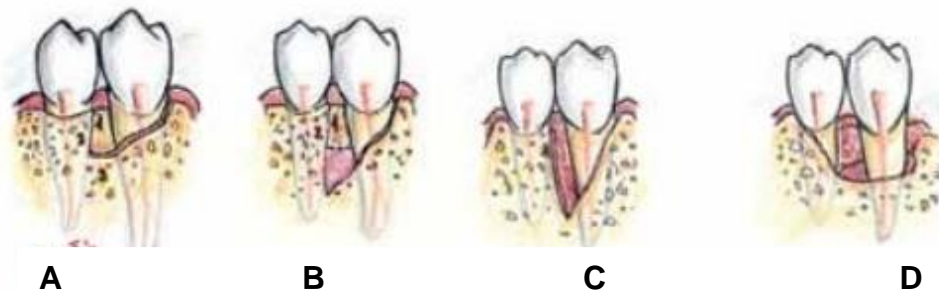


Fig.3 Clasificación de los defectos intraóseos. **A.** Defecto óseo de 1 pared. **B.** Defecto óseo de 2 paredes. **C.** Defecto óseo de 3 paredes. **D.** Defecto óseo circunferencial.

- **DEFECTOS INTERRRADICULARES O EN FURCA:** Es el tipo de defecto que se da cuando la reabsorción de hueso se extiende hasta la zona de furca en un diente multirradicular ¹¹.

Con el paso de los años y los nuevos descubrimientos, se han utilizado injertos de diferentes materiales como tratamiento para estos defectos con el objetivo de conseguir una regeneración ósea y restauración del sistema periodontal.

Cuando en la integridad del hueso existe un defecto de tamaño crítico resultado de un traumatismo, una malformación congénita, enfermedad periodontal o una resección quirúrgica la capacidad de remodelación y regeneración espontánea es nula.

Cuando existe esta situación es claro que el hueso no se regenerará por sí mismo, lo que conlleva a realizar una intervención quirúrgica con el fin de promover la remodelación y regeneración ósea.

Buscar tratamientos que permitan regenerar estos defectos óseos de tamaño crítico ha servido como incentivo en la bioingeniería de tejidos para investigar y obtener resultados exitosos para la futura aplicación clínica¹¹.

2.4 OSTEOGÉNESIS: REGENERACIÓN ÓSEA

La regeneración ósea como proceso natural del cuerpo se da a lo largo de toda la vida, y aunque es por la tercera década cuando se alcanza un balance positivo logrando tener la máxima cantidad de masa ósea, se debe saber que a partir de esa edad y hasta los 50 años se mantendrá esa densidad con pequeñas variaciones, ya que después de los 50 años existirá mayor reabsorción y disminución de la masa ósea.

La regeneración de un tejido cualquiera es la respuesta del organismo que refiere una restitución integral después de una situación traumática, siendo el hueso el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente después de una lesión^{7,9}.

La regeneración ósea es un proceso que da lugar a una respuesta del organismo que involucra a muchas estructuras del cuerpo dentro

de los que están los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular⁷.

Visto desde un nivel microscópico la regeneración ósea se produce en áreas delimitadas de la cortical o de la superficie trabecular, y son llamadas unidades básicas multicelulares o por sus siglas en inglés BMU (basic multicellular units).

Antes de la formación siempre hay un proceso de reabsorción, pero en una persona joven la cantidad de hueso reabsorbido es similar a la de hueso neoformado, por lo que se dice que la regeneración ósea es un proceso equilibrado⁹.

Para poder entender el proceso de regeneración ósea es importante conocer todos los factores involucrados en la regulación de la regeneración ósea y cómo actúan específicamente en este procedimiento:

- Factores genéticos: se dice que estos factores juegan un papel determinante debido a que un alto porcentaje de masa ósea está predeterminado genéticamente¹².
- Factores mecánicos: la estimulación física es vital para el desarrollo óseo, ya que al realizar un estímulo de movimiento se transmite tensión al hueso generando la activación de osteocitos y osteoblastos que estimularán la formación de hueso; en cambio al no realizar un estímulo físico el efecto que genera es la reabsorción ósea¹².
- Factores vasculares: gracias a la vascularización existe un constante acceso de diversas células sanguíneas, minerales, iones, glucosa, factores de crecimiento y oxígeno a la periferia

del hueso, lo que es fundamental para estimular la regeneración ósea ¹².

- Factores hormonales: para que el desarrollo y crecimiento normal del esqueleto se desenvuelva de forma óptima, es necesario que el sistema endocrino funcione correctamente, ya que gracias a hormonas como Calcitropas, Parathormona, Somaotropa u hormona del crecimiento, calcitonina y vitamina D el desarrollo es normal. Todas estas regulan la síntesis y acción de diversos factores que intervienen directamente en el metabolismo óseo ¹².
- Factores locales: algunos son los factores de crecimiento, las citoquinas y las proteínas de la matriz ósea ¹².

Hablando de los diversos factores que intervienen en el proceso de regeneración ósea, debemos conocer su división en fases y en que consta cada una de ellas (Fig. 4):

- a. Fase quiescente: En esta fase el hueso se encuentra en reposo, así que los factores que inician el proceso de regeneración aún no son conocidos ⁹.
- b. Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos ⁹.

- c. Fase de reabsorción: Los osteoclastos empiezan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso finaliza gracias a los macrófagos y permite que se liberen los factores de crecimiento contenidos en la matriz, principalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II) ⁹.

- d. Fase de formación: Al mismo tiempo en las zonas reabsorbidas o que presentan la lesión se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y que estimulan su proliferación.

Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante en el que se adherirá el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación.

A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas ⁹.

- e. Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular. Y de nuevo empieza fase quiescente o de descanso ⁹.

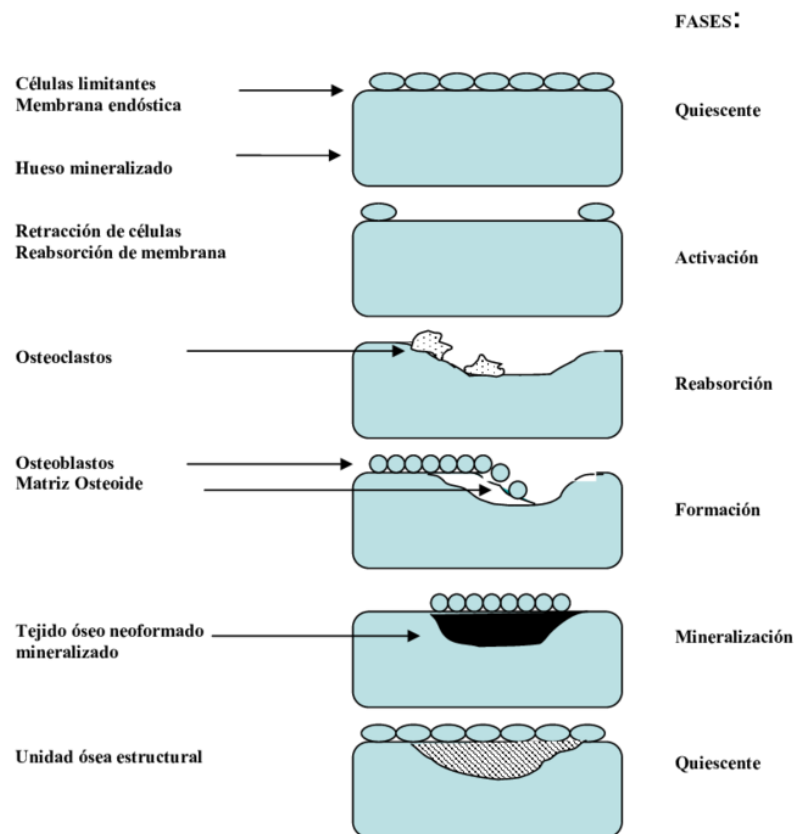


Fig. 4 Fases del remodelado óseo ⁹.

Cuando hablamos de regeneración ósea inducida por algún material debemos tomar en cuenta que siempre existirá un proceso previo de reabsorción en el hueso ya sea post-extracción, atrofia alveolar, trastornos sistémicos, dietéticos o enfermedad periodontal; que es una enfermedad crónica y progresiva en la mayoría de las veces que se presenta.

La prevalencia de esta condición ha favorecido el aumento del número de pacientes que dentro de su tratamiento dental requieren de una rehabilitación de los maxilares, mediante el injerto de hueso o sustitutos óseos, que permitirán aumentar o mejorar las condiciones anatómicas en las zonas alveolares que lo requieren, para una posterior rehabilitación protésica con implantes dentales, por lo que

un proceso de osteogénesis y oseointegración del material que se injertará van de la mano¹³.

Como se mencionó anteriormente la oseointegración es la aceptación y adaptación funcional de un implante insertado en el hueso.

El éxito del proceso depende de la función de dos procesos previos: la osteoinducción y la osteoconducción, y estos a su vez están determinados por el correcto funcionamiento de las diferentes células involucradas (Tabla 3) ¹⁴.

La *osteoinducción* es un proceso mediante el cual las células madre se diferencian en osteoblastos y condroblastos, células que forman el tejido óseo ayudado por determinados materiales o injertos ⁴.

Los materiales osteoconductivos ayudan a la formación ósea durante el proceso de remodelación, gracias a que la proteína morfogenética, que viene de la matriz mineral del injerto, es reabsorbida por los osteoclastos y funge como mediador de la osteoinducción ⁴.

La *osteogénesis* es la deposición de nuevo hueso gracias a las células osteogénicas y se refiere a los materiales capaces de formar hueso inclusive sin la presencia de células mesenquimatosas indiferenciadas locales, es decir, depende únicamente de la adaptación y supervivencia de las células trasplantadas, exclusivamente de los preosteoblastos y osteoblastos.

El injerto osteógeno está constituido por células óseas vivas (osteoblastos), cuya finalidad es inducir los factores de crecimiento para el hueso.^{14, 4, 13}.

Tabla 3. Células y factores involucradas en la osteogénesis ⁹.

Células y Factores	Función
Osteoblastos	Síntesis y secreción de los componentes orgánicos de la matriz ósea
Osteoclastos	Degradación, reabsorción y remodelación ósea.
PTH (parathormona)	Control de la homeostasis de calcio, estimulante de la formación ósea a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β
Glucocorticoides	Diferenciación osteoblástica
BMPs (Proteínas morfogenéticas óseas)	Grupo de 15 proteínas osteoinductivas, que influyen en la diferenciación osteoblástica y estimulan la osteogénesis.
Interleucina 1 (IL-1)	Estimula de forma directa la reabsorción de osteoclastos, aumentando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos y la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos
Interleucina 6 (IL-6)	Estimulante de la reabsorción ósea
Interleucina 11 (IL-11)	Induce la osteoclastogénesis
Prostaglandinas (PG)	Favorecen la reabsorción de hueso
TGF- β (Factor de crecimiento β transformante)	Estimula la formación de hueso ya que aumenta la diferenciación osteoblástica y la síntesis de matriz osteoide, reduce la formación y diferenciación de osteoclastos.

La regeneración ósea debe tener siempre las siguientes condiciones:

- Estabilidad del coágulo: no debe existir un desplazamiento del coagulo, para poder provocar la formación de osteoblastos; ya que en caso de moverse la cicatrización puede tornarse fibrosa.

- Mantenimiento de la cavidad o defecto: es necesario ya que de esta forma se logra llenar de tejido vascular y la proliferación celular.

- Reposo funcional: no permitir que exista una fuerza mecánica.

Posteriormente a que se genera una lesión, en condiciones óptimas, el proceso de cicatrización ósea inicia cuando hay una proliferación de tejido endóstico y se da migración de células hacia el coágulo, para permitir la formación de un hematoma ¹⁵.

Una semana después de que se genera una lesión existe una elevada actividad fibroblásticas, lo que da inicio a la formación de hueso nuevo, a las 2 semanas se comienza a apreciar la maduración de la matriz orgánica reflejándose en la aparición de múltiples trabéculas óseas (callo óseo).

Para poder proporcionar mayor densidad y pasar a ser hueso cortical aumenta la formación de tejido fibroso formando la membrana limitante.

La completa reparación ósea se logra a las 16 semanas, pero es sabido que el hueso cortical continúa su remodelación durante toda la vida ¹⁵.

Actualmente el único material con capacidad osteoinductiva, osteoconductiva y osteogénica es el hueso propio de cada individuo, ningún material biocompatible que estimule la formación de células indiferenciadas en osteoblastos o incluso que incluya proteína ósea morfogénica en su composición contiene las tres propiedades, por lo que se continúa buscando diferentes técnicas que permitan ampliar las posibilidades de tratamiento y que mejoren los pronósticos de estos mismos ¹⁵.

En el área de bioingeniería de tejidos existe un especial interés en desarrollar nuevos biomateriales funcionales que sean capaces de inducir una respuesta biológica capaz de restablecer las funciones de un tejido óseo dañado, específicamente para el área de la Odontología esta búsqueda se ha convertido en la posibilidad de dar una nueva y eficaz alternativa para el tratamiento de los defectos de tamaño crítico generados en el hueso de mandíbula y maxilar para mejorar el pronóstico tanto periodontal como protésico ^{15, 16}.

2.5 ANDAMIOS

En la actualidad el área conocida como ingeniería de tejidos se ha abierto camino en el campo de la medicina tomando fuerza en las diversas investigaciones que se han enfocado en regeneración y recuperación de tejidos, específicamente hueso, cartílago y piel gracias al uso de biomateriales que pueden interactuar de forma específica en el área biológica en el que se utilicen ¹⁷.

La ingeniería de tejidos se basa en el principio de que la regeneración de tejido nuevo se puede inducir por medio de la combinación de células, biomateriales y moléculas bioactivas (Fig. 5) ^{17, 18}.

Dentro del campo de la odontología, la búsqueda constante de materiales que nos ofrezcan un campo más amplio en cuanto al tratamiento de defectos y reabsorción ósea, así como mejores pronósticos en la rehabilitación bucal de los pacientes, ha permitido la colaboración con esta área médica, que a su vez ha establecido diversos criterios y plataformas de trabajo con aplicaciones clínicas y experimentales para la creación de andamios o estructuras 3D, así

como para el aislamiento, proliferación, diferenciación y aplicación celular que permitan obtener mejores posibilidades de tratamiento ¹⁹.

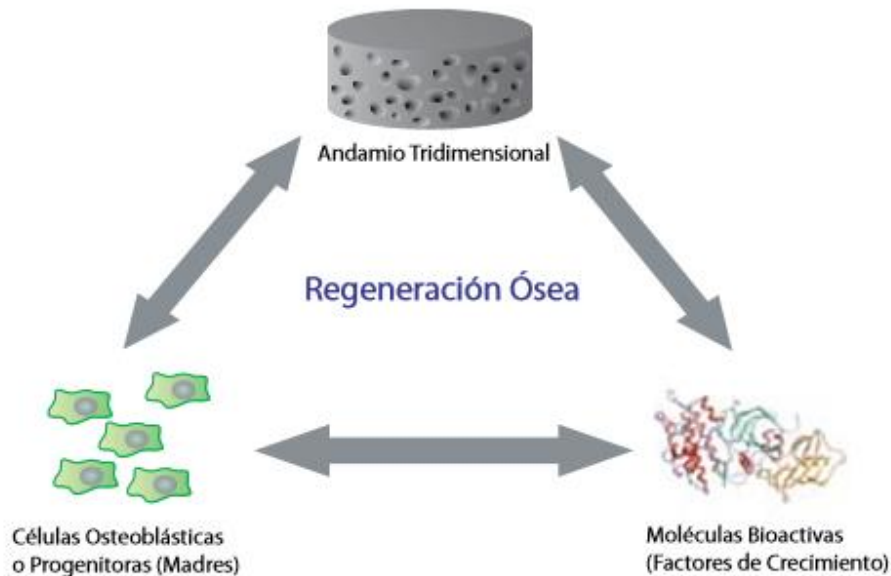


Fig. 5 Principios de la Ingeniería de tejidos. Biomaterial (Matriz tridimensional o andamio), Células (células madre o células diferenciadas. Ej osteoblastos) y un componente molecular (Factores de crecimiento).

Los *andamios* son estructuras tridimensionales provisionales que actúan como una base biomimética que da soporte y funge como una matriz extracelular, permitiendo el libre movimiento de células y su adhesión, proliferación y diferenciación, que posteriormente estimulará la regeneración del tejido que se busca reponer ¹⁸.

La idea principal al fabricar este biomaterial es destinarlo a la fijación y regeneración ósea logrando que interactúe con el tejido de forma específica mediante estímulos a nivel celular y molecular, ya que en la actualidad se pretende encontrar un material funcional e

inteligente capaz de promover la respuesta biológica que se requiere para restablecer las funciones perdidas del tejido ^{18, 19}.

La fabricación de los andamios debe cumplir ciertas especificaciones como son:

- Deben ser tridimensionales y estar conformados de estructuras geométricas que permitirán guiar la regeneración del tejido, junto con los sistemas vasculares y aquellos que permitan el intercambio de fluidos y nutrientes biológicos, así como para la eliminación de los desechos que se generen; razón por la que deben ser estructuras porosas interconectadas ¹⁸.
- Biocompatibles, refiere a la capacidad de un biomaterial para desempeñar la función deseada de acuerdo con el tratamiento médico, sin provocar ningún efecto indeseable local o sistémico en el beneficiario de la terapia ¹⁸.
- Biodegradables, ya que se pretende que conforme el nuevo tejido se genere, el andamio debe permitir que se adhiera a su estructura 3D y que la parte que se vaya degradando no se vuelva toxica para el organismo ¹⁸.
- Biomiméticos, el biomimetismo es de gran importancia, especialmente en el diseño de biomateriales, ya que puede favorecer respuestas celulares concretas y con esto la formación de tejido nuevo a través de interacciones específicas, potenciando la efectividad del tratamiento desarrollado, consiste en imitar la composición y las propiedades estructurales-morfológicas o mecánicas de la

matriz extracelular, con el fin de conducir una adecuada respuesta celular^{18, 20}.

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas para la fabricación de dichos andamios y el éxito en la fabricación de estos depende en la mayoría de los casos del polímero que se utilice, así como de las características de sus superficies y de la potencial función que tenga²¹.

Existen técnicas que incluyen aplicaciones térmicas, de presión, uso de solventes y reactivos químicos que no pueden agregar una línea celular en su fabricación por las condiciones antes mencionadas que, en este caso se vuelve una limitante²¹.

Aun contando con estas características algunas de las técnicas que se han utilizado son:

- A. **Hilado y tejido de fibras**, es una técnica de bajo costo que consiste en un proceso de hilado que generará las fibras a utilizar, estas se recolectarán, se colocarán en un molde y se someterán a un proceso de fusión controlada o superficial.

- B. **Solvent casting y lixiviación de partículas**, esta técnica buscaba fabricar el andamio mediante uso de soluciones poliméricas, compuestos porógenos y solventes, y permitía un mayor control en la formación de los poros.

- C. **Espumado con gas**, consiste en crear discos de polímero comprimido que eran calentados con CO₂ a alta presión generando las porosidades, pero su morfología era cerrada y no tenían interconectividad^{21, 19}.

D. **Electro spinning o electro-hilado** (Fig. 6), consiste en la colocación de un capilar a través del cual se expulsará la solución polimérica que se usará gracias al uso de una bomba de infusión; y que tendrá conectado una fuente de alto voltaje que tendrá dos electrodos conectados uno al lugar de salida de la solución y otro al plato colector donde se depositarán las fibras después de que se evapore el disolvente ²².

Dentro de la creación de andamios fabricados con polímeros, se busca encontrar materiales que refuercen su estructura y que sean biocompatibles para mejorar sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas ¹⁶.

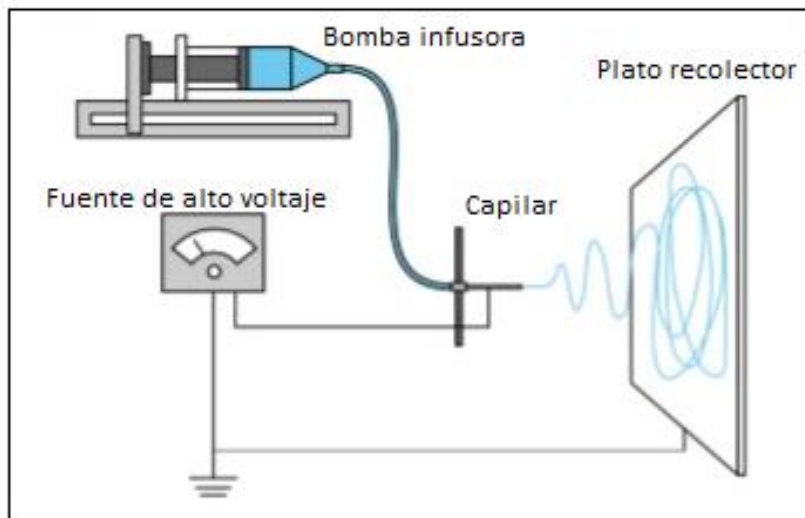


Fig 6. Sistema de electro spinning ²⁰.

Con esta técnica es posible fabricar andamios con características únicas como un área superficial muy grande en relación con el volumen del mismo andamio, tener flexibilidad en la superficie, una

porosidad elevada, que los poros estén interconectados y que el rendimiento mecánico sea superior ¹⁶.

El **ácido poli-láctico (PLA)** es un biopolímero que actualmente es de los que más se utilizan en la síntesis de materiales y uno de los que han ido ganando afines en la investigación dentro de la ingeniería de tejidos para ser usado en experimentos con tejido óseo.

Es un material aprobado por la FDA y que tiene buenas propiedades mecánicas, así como una mínima toxicidad y su biodegradación es predecible; también es un material biocompatible, pero por sí mismo no posee un potencial bioactivo para poder ser utilizado en la ingeniería tisular de hueso ²³.

Al buscar fabricar un andamio funcional y que se pueda utilizar en el área deseada, en este caso en la ingeniería tisular ósea, se debe tener en cuenta que tanto el componente cerámico de un composite como el polimérico son importantes, por lo que se debe elegir cuidadosamente como se combinaran ambos aspectos en un andamio para que sea exitoso ^{23, 24}.

Este es el principal motivo por el que se ha estudiado las propiedades de la hidroxiapatita, que es un mineral formado por calcio (Ca), fósforo (P) y oxígeno (O), tiene una nano estructura cristalina y hexagonal, presenta características de polarización eléctrica que favorecen el crecimiento de los osteoblastos y, que de manera conjunta con las propiedades del PLA, permiten la fabricación de un andamio que tenga las características nanofibrilares que nos proporcionan las ventajas de ambos componentes ^{15, 24}.

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los defectos óseos son pérdidas de hueso que se pueden presentar en diferentes magnitudes, cuando el defecto no es capaz de regenerarse por sí mismo, y necesita ayuda o soporte externo para su reparación, se considera como un defecto de tamaño crítico.

La constatación de dichos defectos, es un grave problema en la rehabilitación oral de un paciente, por lo cual, el área odontológica busca medidas alternativas para poder extender el campo de tratamiento y mejorar el pronóstico en cuanto a la salud oral de los pacientes.

La regeneración ósea es un aspecto de vital importancia cuando hablamos de la rehabilitación protésica de un paciente ya que sin un perfecto estado de salud periodontal que nos brinde el soporte deseado, ya sea a los pilares protésicos o del área idónea para la colocación de implantes, cualquier tratamiento protésico será considerado como provisional o fallido. Por tal motivo es muy importante diseñar y probar andamios que puedan lograr la regeneración ósea de una manera eficaz y precisa.

IV HIPÓTESIS

Los andamios de PLA con hidroxiapatita, sembrados con células osteoblásticas, promueven la regeneración de tejido óseo en defectos de tamaño crítico de calvaria de ratas Wistar.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la regeneración ósea inducida por andamios de PLA con Hidroxiapatita en calvaria de ratas cepa Wistar.

5.2 Objetivos Específicos

- Evaluar las características microestructurales de andamios de PLA y PLA con hidroxiapatita.
- Evaluar las características microestructurales de andamios de PLA y PLA con hidroxiapatita sembrados con osteoblastos.
- Determinar la capacidad de regeneración de los andamios de PLA con hidroxiapatita y osteoblastos en defectos de tamaño crítico en calvaria de ratas *Wistar*.

VI METODOLOGÍA

Fase In Vitro

Fabricación de los andamios

Se prepararon los andamios de PLA y PLA con Hidroxiapatita mediante la técnica de electro spinning.

El proceso de elaboración de las membranas se llevó a cabo disolviendo el PLA a concentraciones de 6% (peso/volumen) en cloroformo.

Para generar los andamios a los cuales se les agregó la hidroxiapatita (HA) los cristales de apatita deficientes en calcio se disolvieron a concentraciones de 0.5 mg en la solución del 6% de PLA obteniendo membranas compuestas (PLA-HA).

Para diseñar y sintetizar las membranas, las soluciones de cada grupo experimental fueron puestas en el equipo de electro hilado empleando una jeringa con una aguja de diámetro de 0.3 mm a una velocidad de 0.04 mL/h con una potencia de electro hilado de 15 Kv dirigido a un colector localizado a una distancia de 15 cm, donde se depositaron las fibras hiladas (Fig. 7).

Posteriormente las muestras se recortaron utilizando un sacabocado con un diámetro de 9 mm (Fig. 8)

Todas las muestras ya cortadas se empaquetaron en bolsas de polipropileno de alta densidad (bolsas Tyvek[®]) y se esterilizaron por medio de plasma con un equipo STERRAD[®]

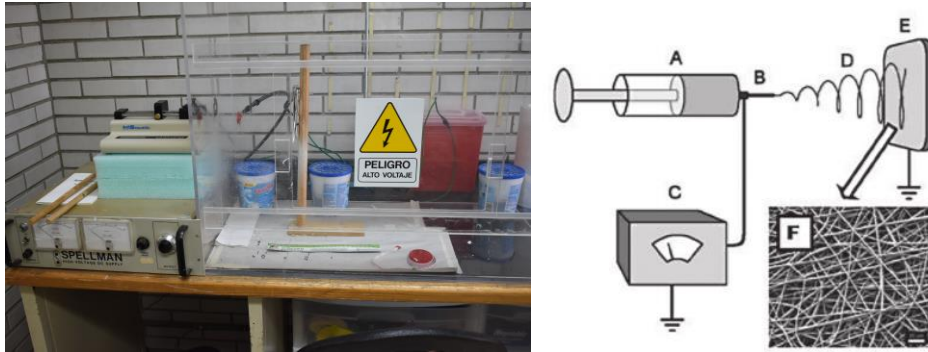


Fig. 7 De derecha a izquierda, Equipo de Electro spinning del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la unidad de Posgrado de Odontología de la UNAM. Figura esquemática del proceso de electro spinning (A. Disolución del polímero, B. aguja metálica dispersora, C. Generador eléctrico, D. Corriente líquida, E. Plato colector, F. Andamio obtenido)

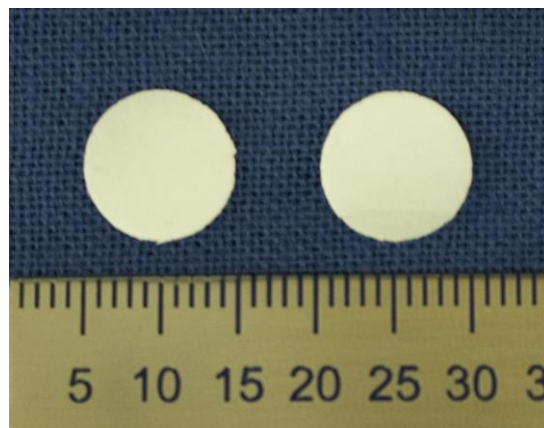


Fig. 8 Andamios con un diámetro de 9 mm, recortados con un sacabocado (Fuente Directa).

Posterior a la esterilización, se colocaron los diferentes andamios en cajas de cultivo, a cada uno de los andamios se les colocaron 3000

células y se metieron a la incubadora durante 3 días, posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído.

Todos los andamios (con células y sin células) se recubrieron con carbono para poderlos observar en microscopia electrónica de barrido a bajo voltaje. Cabe señalar que para la implantación del andamio en los animales se cultivó el mismo número de células en cada uno de ellos y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante una semana.

Fase In Vivo

Se utilizaron 8 ratas macho cepa Wistar jóvenes adultos de 250 g, cada una fue sedada y tranquilizada con ketamina (80 mg/kg de peso) y Xilacina (10 mg/kg) por vía intramuscular, posteriormente se infiltró mepivacaína con vasoconstrictor al 2% en la zona frontal de la cabeza de la rata.

A través de una incisión se accedió al cráneo, se debrido con una espátula 7A las inserciones musculares y colocándose del lado derecho de la sutura media, y bajo irrigación continua con suero fisiológico, se realizó un defecto óseo de tamaño crítico de 9mm utilizando una trefina con 8 mm de diámetro interno teniendo la precaución de no lesionar la dura madre, posteriormente se realiza el clivaje óseo con un cincel.

Una vez hecho el defecto óseo de tamaño crítico se colocó el andamio de ácido poliláctico (PLA) con hidroxiapatita, los cuales contenían los osteoblastos, siendo este grupo el experimental, y en el grupo control se realizó el mismo procedimiento, pero sin colocarle ningún tipo de andamio, posteriormente a todas las ratas (tanto controles como experimentales) se les cubrió la zona del defecto con satín hemostático ajustado a la medida del defecto.

Se suturó la zona con ácido poliglicólico de 3-0 utilizando puntos simples y finalmente se les colocó solución antiséptica en dicha zona (Fig. 9).

Se hizo un seguimiento clínico postquirúrgico, valorando parámetros como: estado general del animal, aspecto de la herida, sangrado, exudado o posibles señales de infección; la evolución de la cicatrización fue buena y sin complicaciones. Durante 5 días se les administró antibiótico y analgésico.

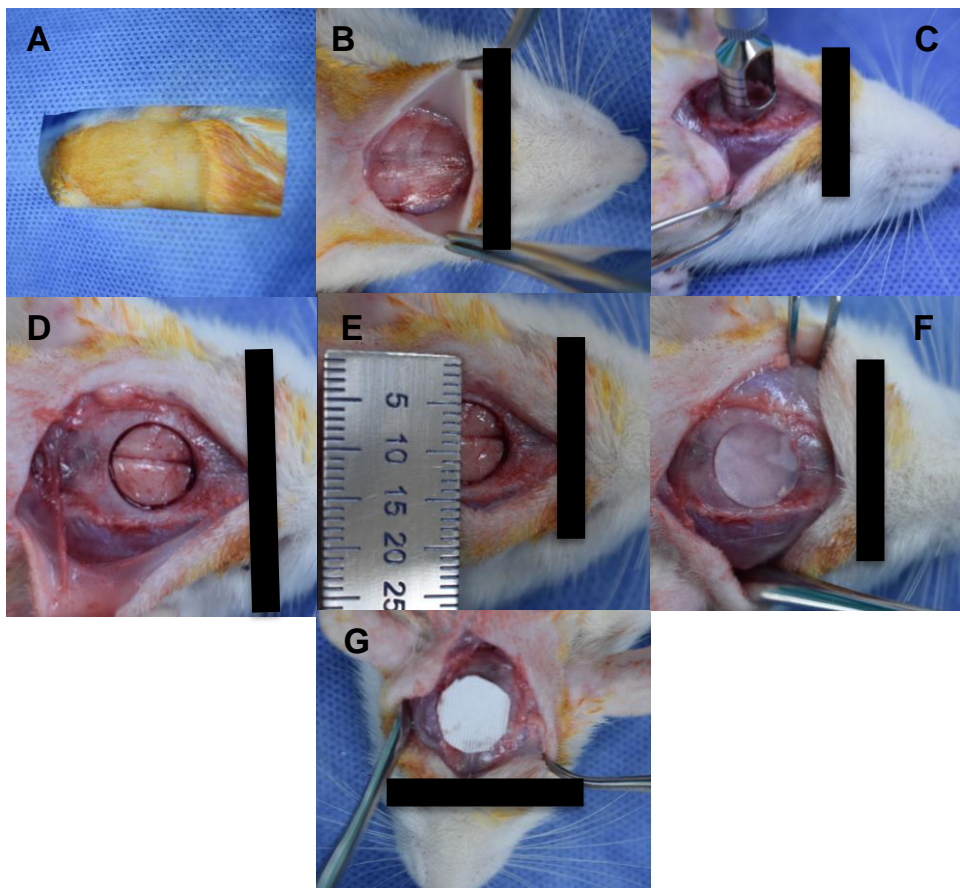


Fig.9 Cirugía en rata cepa Wistar para realizar defecto óseo crítico en calvaria y colocar andamio de PLA con HA al 6%. A) Desinfección de la

zona donde se hará la incisión. B) Se realiza la incisión en la piel y se debrida.

C) Se realiza incisión en la calvaria de la rata con la Trefina. D) Se hace el clivaje óseo E) Se registra la medida del defecto, 9 mm. F) Se coloca el andamio de PLA con Hidroxiapatita al 6%. G) Se le coloca el satín hemostático y se sutura con ácido poliglicólico 3-0 (Fuente directa).

Evaluación ósea por medio de imágenes de micro Tomografía Computarizada μ CT

Se adquirieron imágenes microtomográficas de alta resolución de cada una de las ratas, por medio de un equipo MicroPET/SPECT/CT ARS, Albira-Oncovisión ubicado en el laboratorio de Imagen Molecular del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) (Fig. 10), Este estudio se hizo con alta dosis (0.4 mA) y bajo voltaje (35 kV), y en total se realizaron dos adquisiciones de cada una de las ratas a los 7 y 42 días posteriores a la cirugía.



Fig. 10 Sesión de Microtomografía en el Instituto Nacional de Cancerología (Fuente Directa).

VII RESULTADOS

Fase In Vitro

Se realizó una evaluación de la microestructura de los andamios por medio de microscopía electrónica de barrido.

Andamios de ácido poliláctico (PLA) al 6% a 500x y 1000x

En la evaluación de este andamio podemos observar la estructura superficial de fibras dispuestas de forma intercalada y aleatoria, aunque existen zonas donde la densidad del andamio no es tan espesa, podemos observar que la estructura muestra diferentes porosidades las cuales se encuentran interconectadas (Fig. 11, 12).

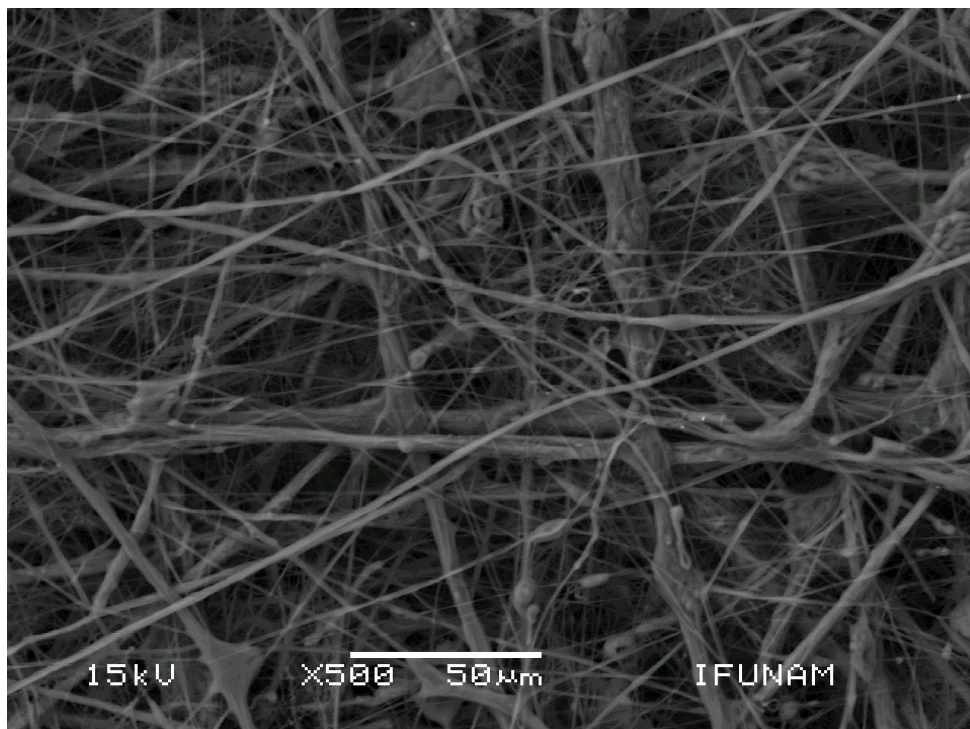


Fig.11 Andamio de PLA al 6% visto a 500x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

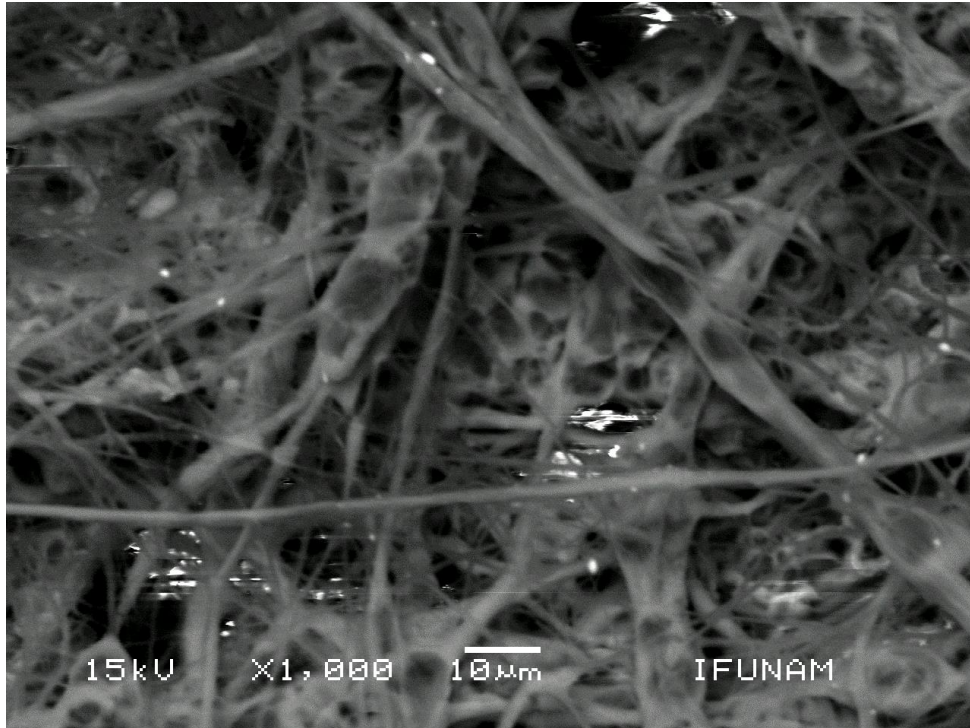


Fig.12 Andamio de PLA al 6% visto a 1000x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

Andamios de ácido poli láctico (PLA) al 6% con células osteoblásticas implantadas a 200x, 500x y 1000x

En el andamio al cual se le colocaron las células osteoblásticas, se puede observar, como las células se adhieren a la superficie estructural del andamio, de igual manera se observan las fibras dispuestas de forma intercalada y aleatoria, pero sosteniendo a las células dispuestas de una misma forma aleatoria, también existen zonas donde la concentración de células es mayor que en otras, formándose grupos celulares en dicho andamio. (Fig. 13,14,15).

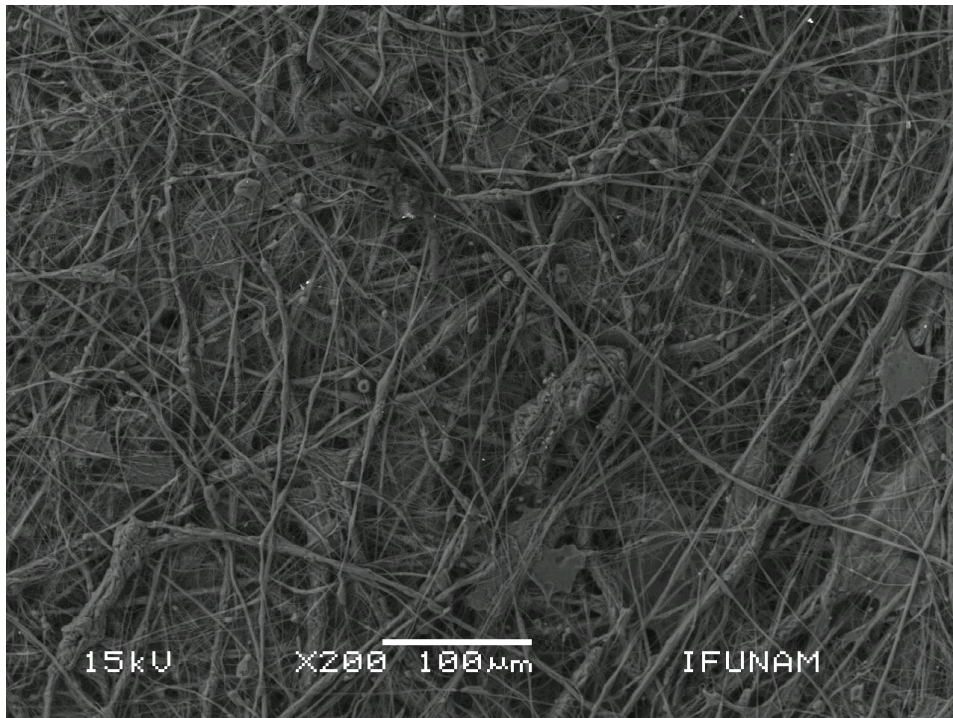


Fig. 13 Andamio de PLA al 6% con células osteoblásticas implantadas, visto a 200x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

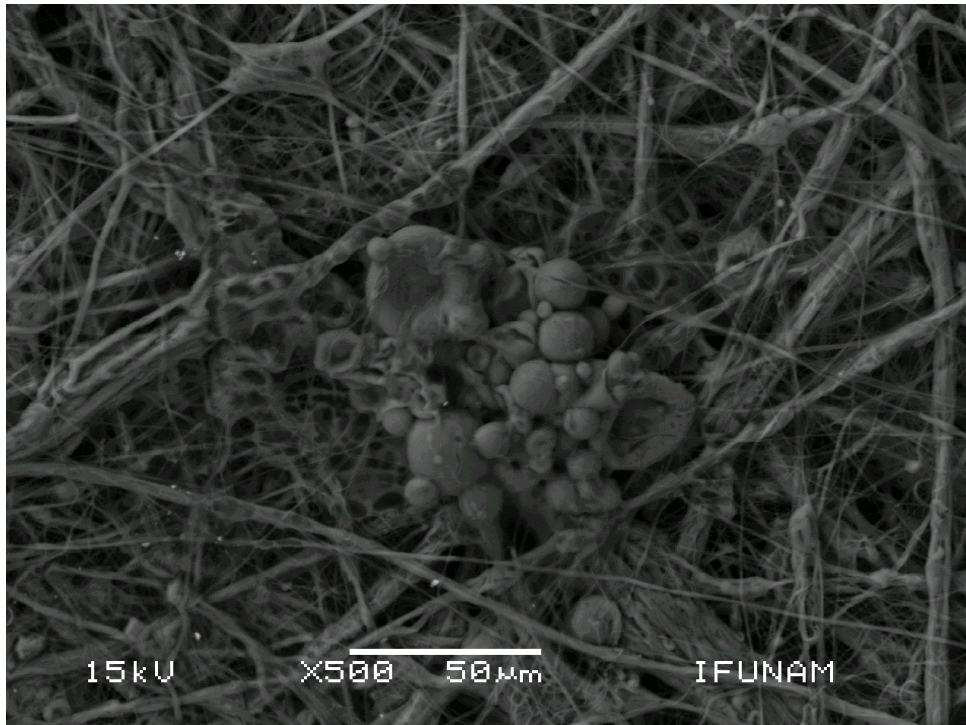


Fig. 14 Andamio de PLA al 6% con células osteoblásticas implantadas visto a 500x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

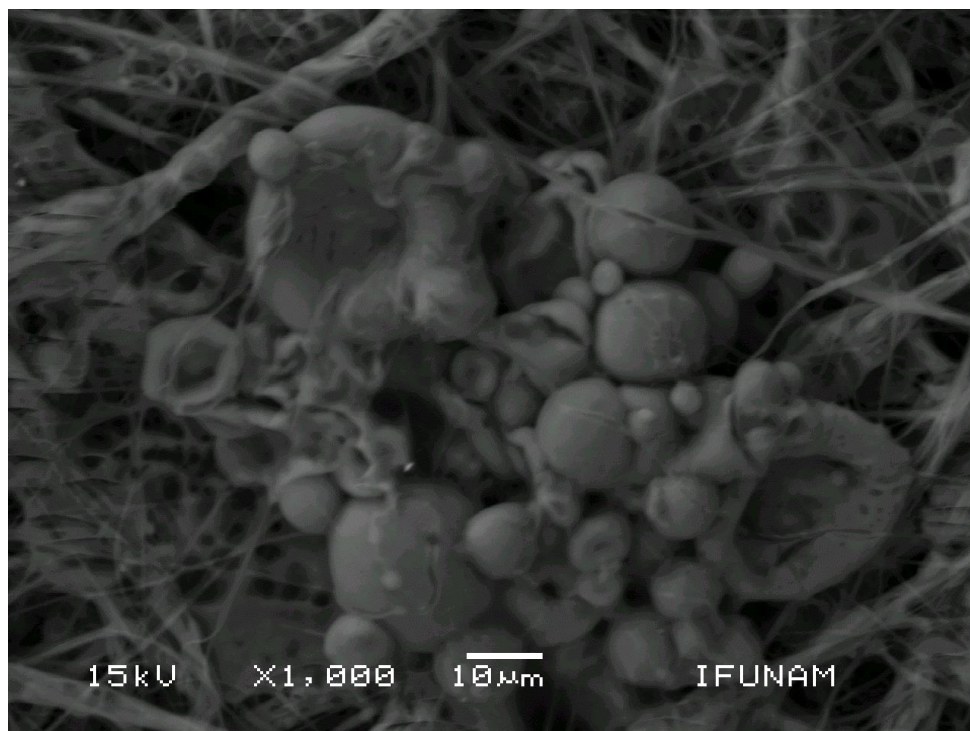


Fig. 15 Andamio de PLA al 6% con células osteoblásticas implantadas visto a 1000x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

Andamios de ácido poliláctico (PLA) al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% a 500x y 1000x

En los andamios que dentro de su composición tienen hidroxiapatita se puede observar que se encuentra dispersa por toda la superficie del andamio y que la estructura del andamio no es modificada por este componente.

Gracias a que las fibras se disponen de forma aleatoria la saturación de hidroxiapatita varía, además la interrelación que guardan la hidroxiapatita y el ácido poliláctico (PLA) hace que se forme una buena estructura de soporte, así como una notable adhesión por parte de la hidroxiapatita, por lo cual se logra hacer un andamio con mayor estabilidad al andamio (Fig. 16, 17).

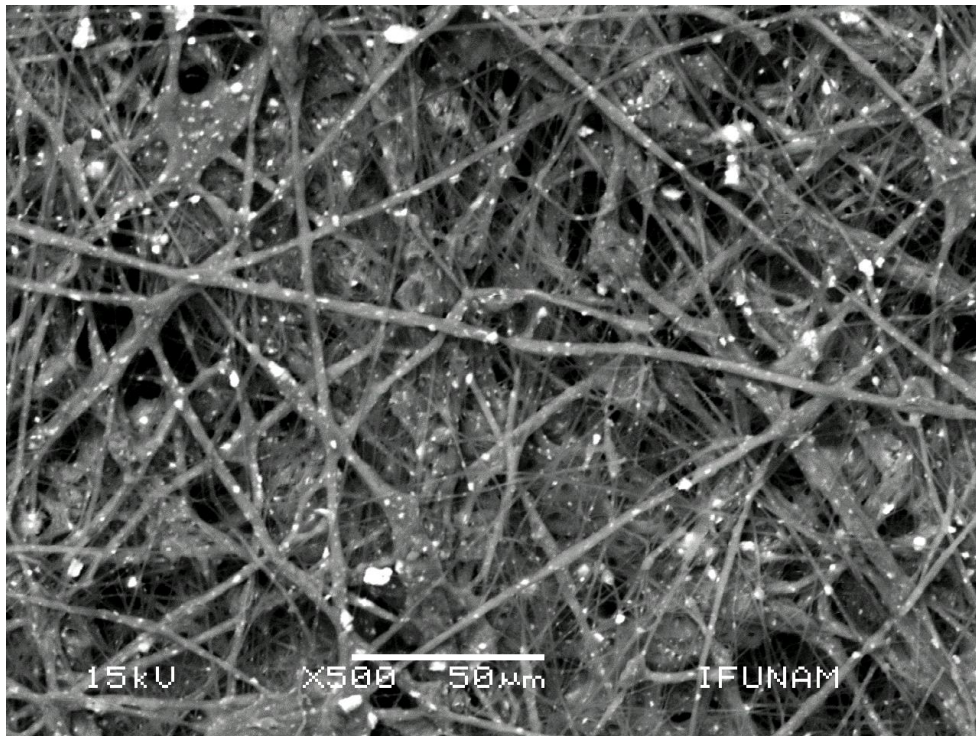


Fig. 16 Andamio de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% visto a 500x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

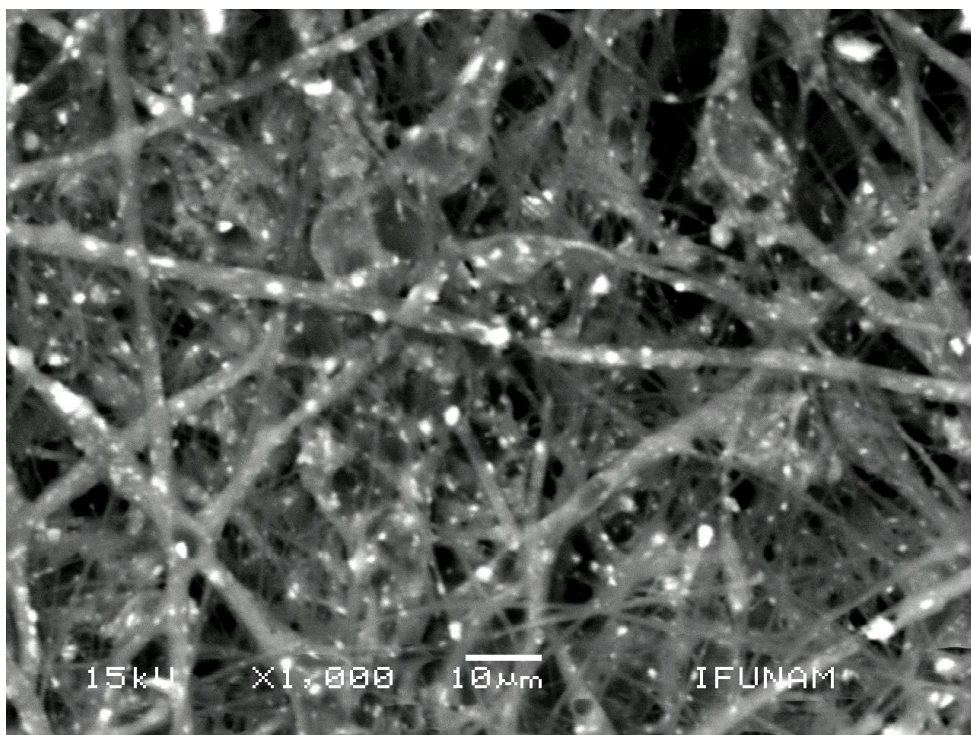


Fig. 17 Andamio de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% visto a 1000x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

Andamios de ácido poliláctico (PLA) al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% con células osteoblásticas implantadas a 500x y 1000x

Poder evaluar la estructura de este andamio nos da la evidencia necesaria para poder confirmar que los lineamientos establecidos por la literatura de las características ideales de un andamio funcional son acertadas, ya que en este andamio podemos ver la estructura de las fibras que conforman la base del andamio (hechas de ácido poliláctico al 6%) y la forma en la que están dispuestas formando porosidades interconectadas que permiten la adhesión de la hidroxiapatita y de las células osteoblásticas implantadas dando así una mayor estabilidad a los componentes (Fig. 18 y 19)

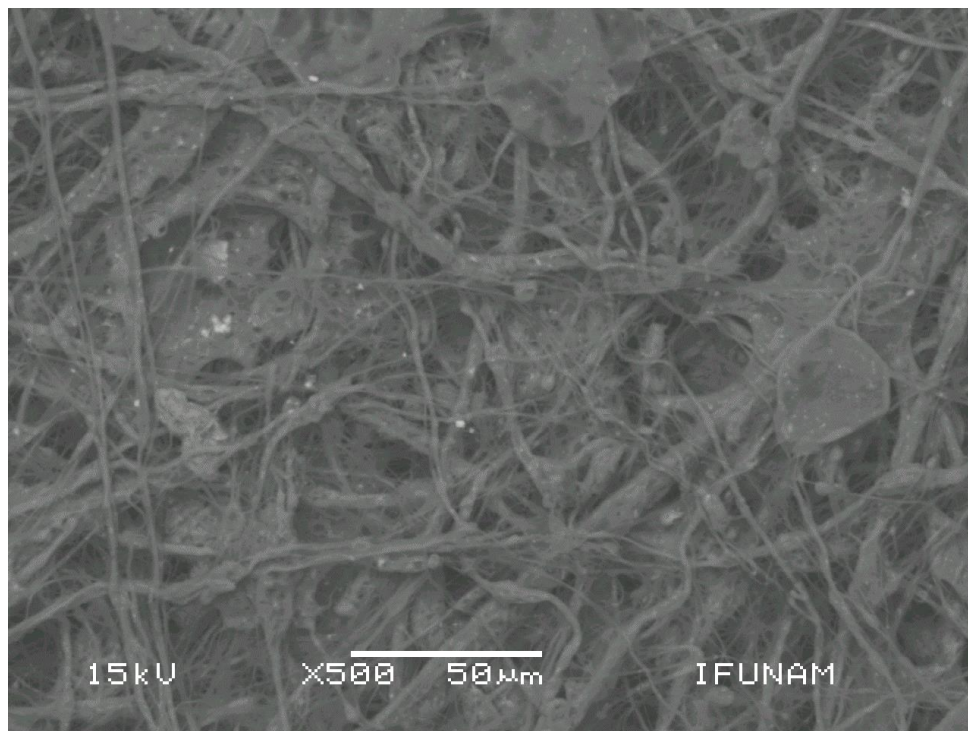


Fig.18 Andamio de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% y con osteoblastos visto a 500x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

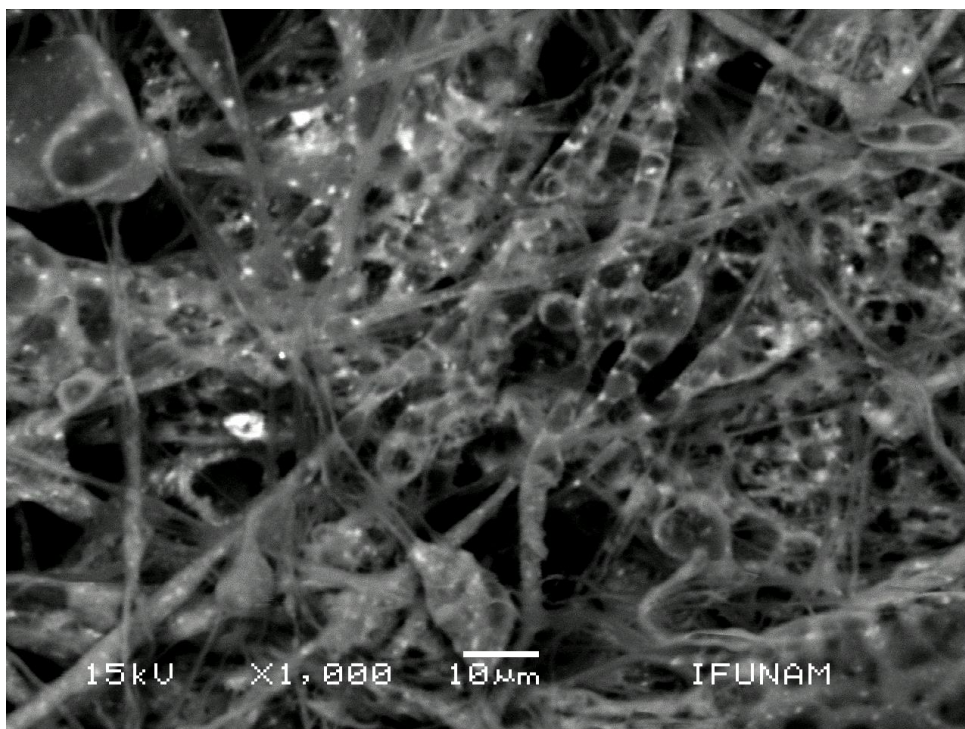


Fig.19 Andamio de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% con osteoblastos visto a 1000x con microscopía electrónica de barrido (Fuente Directa).

Fase In Vivo

Evaluación ósea por medio de imágenes de micro Tomografía Computarizada (μ CT)

Se realizaron dos sesiones donde se adquirieron imágenes microtomográficas de alta resolución de cada una de las ratas, por medio del equipo MicroPET/SPECT/CT ARS, Albira-Oncovisión ubicado en el laboratorio de Imagen Molecular del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), para poder registrar la evolución del grupo experimental y del grupo control, durante ambas tomas los animales se mantuvieron sedados con Isoflurano a una concentración de 0.2g (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación a los 7 días de la cirugía del grupo experimental y el grupo control (Fuente Directa).

<i>7 días de evolución – Grupo Experimental</i>	<i>7 días de evolución – Grupo Control</i>
R1 PLA HA 7D No se encontró evidencia	R1 CONTROL 7D No se encontró evidencia
R2 PLA HA 7D No se encontró evidencia	R2 CONTROL 7D No se encontró evidencia
R3 PLA HA 7D No se encontró evidencia	R3 CONTROL 7D No se encontró evidencia
R4 PLA HA 7D No se encontró evidencia	R4 CONTROL 7D No se encontró evidencia

En la evaluación con las imágenes de μ CT del grupo control (Fig. 20) no se encontró evidencia de formación de tejido mineralizado en ninguno de los días (7 y 42 días).

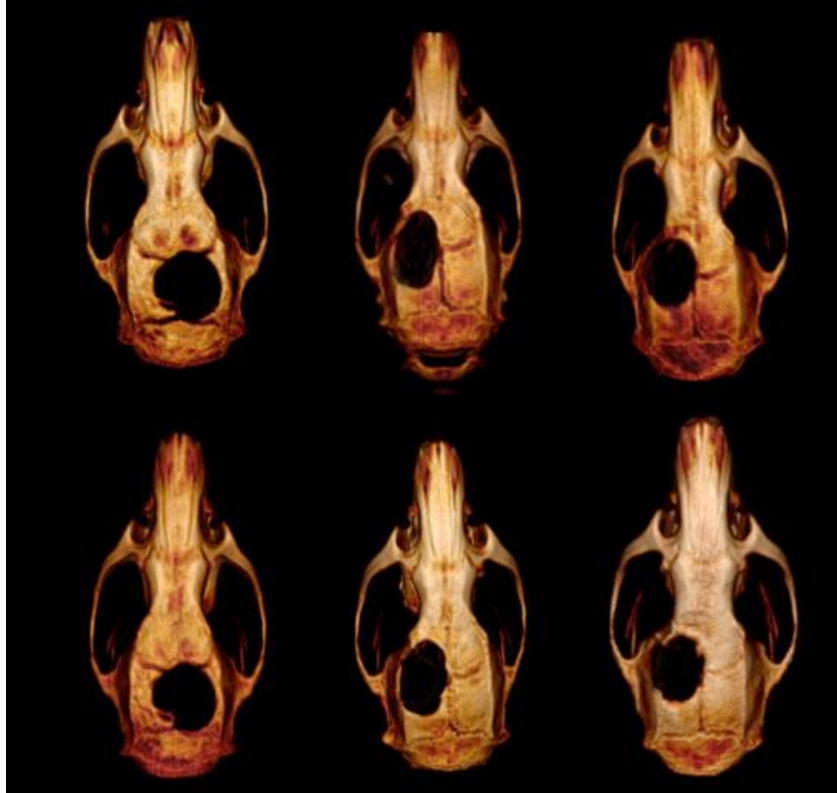


Fig.20 *Grupo Control*, En el panel superior se muestran las 3 ratas del grupo control a los 7 días y en el de abajo se observan las mismas 3 ratas en la adquisición de los 42 días. En ninguno de los dos periodos de tiempo se observan evidencias de formación de tejido mineralizado (Fuente Directa).

En la primera evaluación con el μ CT del grupo experimental no se encontró evidencia de formación de tejido mineralizado, algo que ya esperábamos pues a los 7 días de que se genera una lesión ya que ,apenas comienza el proceso de reparación ósea (Fig. 21, 22, 23).



Fig. 21 *Grupo experimental Rata 1-* Tomografía hecha a los 7 días, se aprecia únicamente el defecto de tamaño crítico (Fuente Directa).

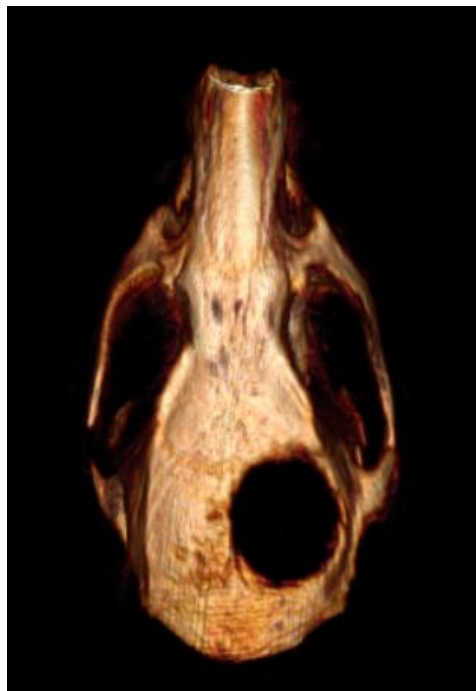


Fig. 22 *Grupo experimental Rata 2-* Tomografía hecha a los 7 días. Se puede apreciar únicamente el defecto de tamaño crítico (Fuente Directa).



Fig. 23 *Grupo experimental Rata 3-* Tomografía hecha a los 7 días. Se puede apreciar únicamente el defecto de tamaño crítico (Fuente Directa).

Posterior de la toma de μ CT a los 7 días los animales se mantuvieron en observación en el Bioterio de la Unidad de Posgrado e Investigación, y a los 42 días posterior a la cirugía se realizó un nuevo estudio de imagen.

En cada uno de los sujetos de prueba a los que se le colocó el andamio de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% y células osteoblásticas, se encontró formación de tejido mineralizado en el defecto de tamaño crítico (Fig.24, 25, 26)

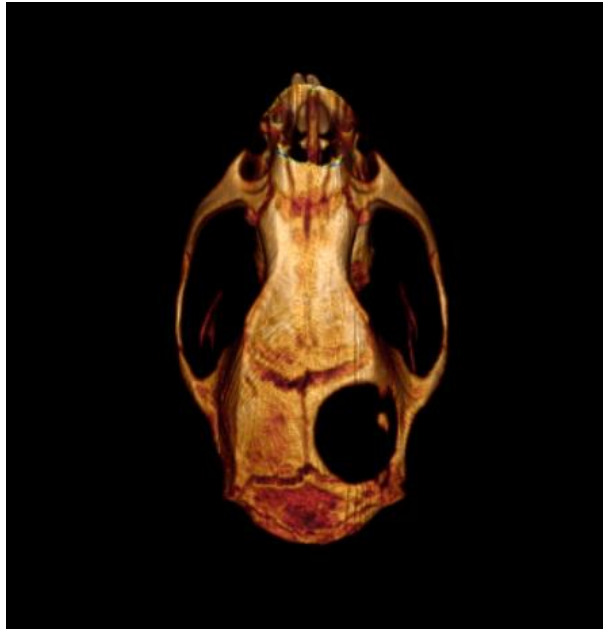


Fig. 24 Rata 1, Microtomografía realizada a las 6 semanas de la colocación del andamio de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% y células osteoblásticas. Se observa la formación de tejido mineralizado de forma aislada en el defecto de tamaño crítico (Fuente Directa).

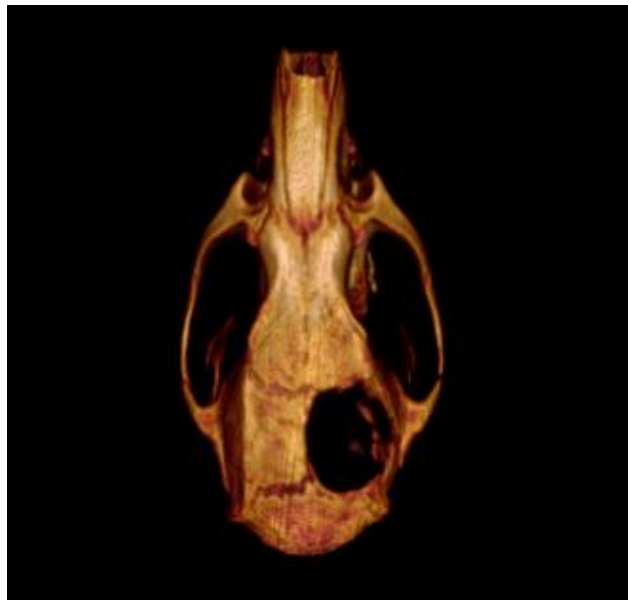


Fig. 28 Rata 2, Microtomografía realizada a las 6 semanas de la colocación del andamio de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% y células osteoblásticas. Se observa la formación de tejido mineralizado de forma aislada y con una conexión al tejido óseo existente en el defecto de tamaño crítico. (Fuente Directa)

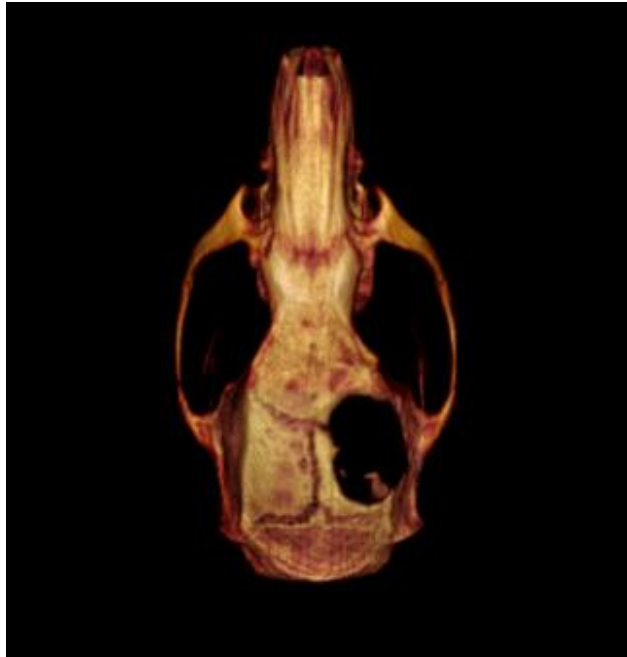


Fig. 12 Rata 3, Microtomografía realizada a los 42 días de la colocación del andamio de PLA al 6% con Hidroxiapatita al 0.5% y células óseas.. Se observa formación de tejido mineralizado con conexión al tejido óseo existente en el defecto de tamaño crítico. (Fuente Directa)

VIII DISCUSIÓN

La presente investigación fue diseñada para evaluar y describir *in vitro* e *in vivo*, por medio de microscopia electrónica de barrido y análisis por medio de imagen, el comportamiento de los andamios de ácido poliláctico al 6% (PAL) con hidroxiapatita al 0.5% y cultivados con células osteoblásticas.

Cuando se conocen las complicaciones y limitaciones de dar tratamiento a los defectos óseos de tamaño crítico provocados por enfermedad periodontal, traumatismos, defectos congénitos o patologías con técnicas como colocación de autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos(18), se busca diseñar una técnica que mejore las probabilidades de éxito, razón por la cual esta investigación se orientó en evaluar la regeneración ósea *in vivo* en un modelo animal en diferentes momentos experimentales (7 y 42 días) para determinar su biocompatibilidad y predictibilidad como inductor de regeneración ósea.

El andamio se llevó a cabo disolviendo el PLA a concentraciones de 6% (peso/volumen) en cloroformo, se les agregó la hidroxiapatita (HA) al 0.5% obteniendo membranas compuestas (PLA-HA) y después de ser esterilizados se les sembró células osteoblásticas. Estos materiales fueron seleccionados con base a la triada de la ingeniería de tejidos y las propiedades de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis que tienen de manera conjunta el PLA, la Hidroxiapatita y las células osteoblásticas²³.

La evaluación comparativa de las características de los andamios de PLA/HA con células osteoblásticas mediante microscopia electrónica de barrido, nos dan evidencia de la estructura que debe poseer un

andamio ideal que cumpla con el objetivo de ser un material predecible en la regeneración ósea, resultados que coinciden con la investigación de Altamirano Valencia y colaboradores en el 2016 ¹⁶, quienes establecen que la biocompatibilidad del PLA con la HA favorecen el potencial osteogénico de ambos compuestos, y que gracias a sus características y química superficial este andamio favorece la adhesión celular aumentando la respuesta biológica de este sobre el organismo aplicado.

Es importante resaltar que la elaboración de este andamio se llevó a cabo siguiendo los parámetros de la Triada de ingeniería de tejidos y preparándolos para poder ser evaluados con microscopía electrónica de barrido, técnica necesaria para poder evaluar que la estructura y conformación del andamio sea la adecuada.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con el trabajo realizado por Álvarez Barreto en el 2014 ²⁰.

Los controles realizados in vivo mostraron que el andamio de PLA/HA con células injertadas indujo la formación de tejido mineralizado en la calvaria de las ratas del grupo experimental dándonos evidencia de la regeneración ósea después de 42 días.

Estos hallazgos pueden ser comparados en tiempo con estudios realizados para evaluar la estimulación e inducción de regeneración ósea con injertos de hueso autólogo realizados por Chaves Netto y colaboradores en el 2009 ¹⁰, donde la evaluación realizada a las 6 semanas arrojan que la remodelación de hueso está iniciando.

Los resultados encontrados en esta investigación nos ofrecen como alternativa el uso de la ingeniería de tejidos como auxiliar en el tratamiento de los defectos de tamaño crítico como nos mencionan Velasco y Garzón en el 2017 ²⁶, quienes mencionan la importancia que tienen las características de ser reabsorbible, bioactivo y

osteoconductor al elegir un andamio fabricado de ácido poliláctico con hidroxiapatita para inducir la formación de tejido mineralizado.

Por último, la evaluación mediante el uso de μ CT es indispensable cuando se busca tener imágenes específicas y certeras de la evolución de un tratamiento donde se está induciendo la generación de tejido mineralizado, gracias a esta evaluación nuestros resultados fueron determinantes y pudimos confirmar que el uso de andamios de PLA al 6% con HA al 0.5% con células osteoblásticas estimulan la formación de tejido mineralizado a los 42 días de evaluación, dando como resultado la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en hueso.

El uso de estudios microtomográficos es comparable al trabajo realizado por Cruz Olivo y colaboradores en el 2015 ²⁷, quienes plantean el uso de imágenes tomográficas para la evaluación de la formación ósea como alternativa para obtener resultados verídicos. Cabe recalcar que con este tipo de técnicas disminuye la variabilidad biológica ya las imágenes se realizan en el mismo grupo de animales.

IX CONCLUSIONES

- 1) Los andamios fibrilares de ácido poliláctico (PLA) al 6% con hidroxiapatita al 0.5% presentaron una estructura favorable para la adhesión celular.
- 2) El uso de andamios fabricados de ácido poliláctico (PLA) al 6% con hidroxiapatita al 0.5% con células osteoblásticas indujeron la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en calvaria de ratas cepa Wistar.
- 3) El uso de Microtomografía es un auxiliar indispensable para la evaluación de la regeneración del tejido óseo, ya que nos da imágenes que podemos manipular según lo que necesitemos observar, desde tejidos blandos, tejidos duros, la localización específica del área a evaluar, lo que nos permite tener resultados específicos.
- 4) La implantación de osteoblastos en el andamio de PLA con hidroxiapatita indujo la proliferación celular en el defecto de tamaño crítico, favoreciendo el inicio de la reparación ósea y la formación de hueso nuevo en la misma área apreciable a las 6 semanas de la cirugía.

X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gonzalez R. Origen y evolucion de los implantes dentales. Rev haban cienc méd. 2009;8(4):9.
2. Rivera SM, Szalay ER, Santos AT, Tapia SO. Rehabilitación protésica multidisciplinaria : Reporte de un caso clínico Multidisciplinary prosthetic rehabilitation . Clinical case report. 2012;16:112–22.
3. Martínez-González JM, Cano Sánchez J, Campo Trapero J, Martínez-González MJS, García-Sabán F. Diseño de los implantes dentales: Estado actual. Av en Periodoncia e Implantol Oral. 2002;14(3):8.
4. Acosta JCV, Parra NSL, Garzón-Alvarado DA. Mecnobiología de la interfase hueso-implante dental. Rev Cubana Estomatol. 2010;47(1):14–36.
5. Condori Pamela L. Cirugía pre.protesica. Rev Actual Clin [Internet]. 2012;24:1178–81. Available from: http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v24/v24_a10.pdf
6. Gómez JG. El proceso de remodelacion osea. Ortho-tips. 2008;4:170–6.
7. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I, Alobera Gracia MA, Del Canto Pingarrin M, Blanco Jerez L. Bases fisiologicas de la regeneración osea I. Histologia y fisiologia del tejido oseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11(1):32–6.
8. Alberto F, González L. Estudio de los diferentes modelos de regeneración ósea guiada previa a la colocación de implantes dentales osteointegrados.Salamanca: Universidad de Salamanca; 2005;
9. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I, Alobera Gracia MA, Del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11(2):92–8.
10. Analyses H, Defects R, Defects C, Duque H, Chaves DM, Olate S, et al. Análisis Histológico del Proceso de Reparación en Defectos Óseos . Reconocimiento de Defectos Críticos. Int J MORPHOL. 2009;27(4):1121–7.
11. Martínez-lage JF, Azorín JFM, Andrés GS, López JF.Tratamiento de defectos intraóseos causados por enfermedad periodontal agresiva mediante derivados de la matriz del esmalte: Revisión y descripción de la técnica. Periodoncia y Osteointegración. 2013; 23(1): 49-58.
12. Garcia A. ¿Como se renueva un hueso?. SEBBM Divulg la Cienc al alcance la mano. 2011;1:1,2.
13. Trujillo DM, Isabel ID, Brito M, René II. Injertos óseos en implantología. Rev Medica Electron. 2014;36(4):449–61.
14. Vanegas J, Landinez N, Alvarado D. Generalidades de la

- interfase hueso-implante. Rev Cuba Investig Biomédicas. 2009;28(3):130–46.
15. Ricardo JH. Cicatrización y regeneración ósea de los maxilares después de una quistectomía : reporte de un caso y revisión de la literatura. Dossier Avances en materiales dentales. 2011;30(65):71–8.
 16. Ali A, Valencia A, Phd NVB, Carolina F, Vázquez V, K TV, et al. Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA / Hidroxiapatita. ODOVTOS-Int. J. Dent. Sc. 2016;3(18):51–62.
 17. Sesman-bernal AL, León-pérez JA, Fernández-sobrino G. Actualidades en regeneración y remodelación ósea craneal. Revisión de la literatura. Acta Pediatr Mex. 2007;28(5):183–92.
 18. Barreto JFA. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. Revista de Estudios Transdisciplinarios. 2009; 1 (2): 98-109
 19. Sabino MA, Loaiza M, Dernowsek J, Rodrigo R. Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicación en ingeniería de tejidos. Rev Lat Met Mat. 2017;37(2).
 20. Duran H a. E, Ballesteros DYP. Adhesión de osteoblastos sobre andamios de PLA-PLG- biocerámico-colágeno, fotosensibilizados con luz UV. Rev Ion. 2015;27(2):7–15.
 21. Celular YR. Ingeniería de tejidos y biocompatibilidad: nanomateriales biomiméticos, agua, mineralización y respuesta celular.RDU. 2015;16:1–15.
 22. Duque Sánchez LM, Rodríguez L, López M. Electrospinning: La era de las nanofibras. Rev Iber Polímeros. 2014; 14 (141): 10–27.
 23. Correa Liz Solange, Zuluoaga Fabio, Valencia Carlos, godoy Jorge. Elaboración de Andamios Porosos Osteoinductivos de Poli (Ácido L-Láctico)/Quitosano Para La Regeneración de Tejido Óseo. Rev Col de Materiales. 2015; 6: 34-53.
 24. García Oscar, Pérez Roco, Arredondo LM, Crespo GM, Quiros AY. Algunas consideraciones actuales sobre regeneración ósea.AMC.2002; 6 (6) :654–60.
 25. Ochandiano S. Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. Rev esp Cir Oral y Maxilofac. 2008;5:324–6.
 26. Antonio M, Peña V, Alexander D, Alvarado G. Implantes Scaffolds para regeneración ósea. Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. BVS. 2016;1–11.
 27. Duque Netto H, Olate S, Klüppel L, das Graças Alfonso de Miranda Chaves M, de Oliveira Salgado I, Vásquez B, et al. Regeneración Ósea en Defectos Críticos Tratados con Matriz Ósea Bovina Inorgánica Aplicada con dos Diferentes Vehículos. Int J Morphol. 2013;31(2):367–72.