



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PROGRAMA DE TITULACIÓN POR ALTO PROMEDIO (T.A.P.)

EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN DEFECTOS DE
TAMAÑO CRÍTICO EN RATAS *WISTAR* POR MEDIO DE ANDAMIOS
FIBRILARES DE PLA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

IVÁN ALFONSO GARCÍA HERRERA

TUTOR: Mtro. PEDRO ALBERTO LÓPEZ REYNOSO

ASESORA: Dra. JANETH SERRANO BELLO



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.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS



Dedicatoria

La culminación de mi formación profesional y en específico este trabajo está dedicado a mis dos pilares:

Mi madre Esperanza Herrera García, madre tú que toda la vida has entregado todo por mí, tus desvelos, tus madrugadas, cada segundo de tu vida que dedicaste a hacer de mí un hombre de bien hoy tiene su recompensa, sin tu paciencia, amor, aliento y esa confianza brindada hacia mí no hubiese logrado estar aquí, siempre te lo dije, te encargaste de todo en mi mundo para que mi mente fuera libre siempre de dedicarme a esto que me fascina, te amo mamá y te estaré eternamente agradecido por ello.

Mi padre Luis Alfonso García, ese día que en algún momento mencionaste que viviría, ese día en el que comprendería tu forma de ser y de actuar en algunas situaciones que no comprendí años atrás ha llegado, quiero decirte que siempre te he admirado, desde pequeño has sido un ejemplo a seguir, sembraste en mí buenos valores y los alimentaste con amor día a día a tu manera, siempre haz velado por darme lo mejor a tus posibilidades y el día de hoy te puedo decir que lo lograste, sin ti no hubiese llegado tan lejos y tan alto, espero que te sientas orgulloso de mí así como yo de ti. Este es el inicio de un nuevo camino y espero poder seguir contando contigo para todo como hasta el día de hoy mi viejo gracias.

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a la máxima casa de estudios, la institución educativa más grande e importante de este país mi amada UNAM, que me acogió cuando era un niño y me permitió formarme en sus instalaciones, bajo la tutela de grandes mentores dándome una formación profesional y humana, 8 años de mi vida las pasé en tus aulas y espero regresarte aunque sea un poco de todo lo que me has brindado participando en la formación de próximas generaciones de profesionistas.

A mi hermana Fernanda, te agradezco por ser partícipe día a día en este proyecto de vida, por soportar mis desvelos y malos ratos, brindándome siempre tu apoyo incondicional te amo pequeña, siempre puedes contar conmigo.

A Yunuhen Jasso, peque, te agradezco por cada memoria que has generado en mí, por tu amistad incondicional y por todo el amor que me profesas, fuiste la motivación que requería en este último escalón, gracias por cada minuto de tu vida que dedicas a hacerme feliz.

Al director de mi amada facultad el Dr. José Arturo Fernández Pedrero, por preocuparse tanto por la formación de profesionistas con gran calidad, por brindar las facilidades para la realización de este proyecto y los recursos económicos para ello.

A el doctor Afranio Salazar, en usted encontré un ejemplo a seguir, pero más allá del gran profesionista que es, es una gran persona y un gran amigo, tiempo atrás cuando necesitaba ayuda fue usted quien creyó en mí, le agradezco por su tiempo, su guía esperando haber logrado llenar las expectativas y la confianza que deposito en mí

A la doctora Janeth Serrano, la mujer más preparada profesional e intelectualmente que conocí durante toda mi formación, gracias por su tiempo y su paciencia ojalá más generaciones tengan la oportunidad de estar bajo su tutela

Al Dr. Pedro López, fue usted quien tuvo la visión y la confianza por primera vez en mí para llevar a cabo este proyecto, a su lado aprendí mucho y viví experiencias que abarcan más allá de lo convencional que respecta a la carrera de cirujano dentista, nunca imagine que algún día operaría a una rata y expondría su materia gris y gracias a usted tuve ese placer.

Al Dr. Marco Álvarez director del laboratorio de Bioingeniería de Tejidos del DEPeI de la UNAM, gracias por su tiempo y conocimientos brindados en este proyecto, sin usted este trabajo no hubiese sido posible.

A mis hermanos José Luis y Armando, sin duda alguna con ustedes he vivido incontables e invaluable experiencias que me han llevado en buena parte a ser la persona que hoy en día la sociedad conoce, gracias hermanos por siempre estar ahí para mí los quiero y espero esto les sirva de ejemplo para que aprendan como es que se hace esto como un pro master de élite.

A mis amigos de la carrera Joaquín, Danika y Retana, amigos sin lugar a dudas son de lo mejor que me llevo en esta formación profesional, vivimos la carrera a tope, gracias por soportarme y por ser incondicionales, espero que nunca termine nuestra amistad y por supuesto ser quien opere en sus consultorios porque sí les falla.

A Rocko, mi amigo, mi compañero de desvelos.

“Es por mí que se va a la ciudad del llanto, es por mí que se va el dolor eterno y al lugar donde se sufre la raza condenada, yo fui creado por el poder divino la suprema sabiduría y el primer amor, y no hubo nada que existiera antes que yo, abandona la esperanza si entras aquí.”

(Dante Alighieri. *La Divina Comedia*, canto III siglo XIV)



ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	10
3. ANTECEDENTES	12
3.1. Enfermedad periodontal	18
3.1.1. Características	18
3.1.2. Clasificación	19
3.1.3. Diagnóstico	20
3.1.4. Etiopatogenia	20
3.2. Técnicas reconstructivas periodontales	21
3.2.1. Regeneración Tissular Guiada (RTG)	22
3.2.1.1 Tipos de injertos óseos	25
3.2.1.1.1. Injerto óseos autógenos	26
3.2.1.1.2. Autoinjertos	27
3.2.1.1.3. Xenoinjertos	27
3.2.1.2. Sustitutos óseos	28
3.2.1.2.1. Biocerámicos	28
3.2.1.2.2. Cristales bioactivos	28
3.2.1.2.3. Materiales derivados del coral	28
3.2.1.3. Uso de membrana y andamios en la regeneración periodontal	29
3.2.1.3.1. Membrana no reabsorbible	29
3.2.1.3.2. Membrana reabsorbible	30
3.2.1.3.3. Ácido poliláctico (PLA)	32
3.2.1.3.3.1. Propiedades del PLA	33
3.2.1.3.3.2. Usos del PLA	34
3.3. Osteoblastos	35
3.4. Implantes dentales	37
3.5. Defecto crítico en calvaria de ratas	41
3.6. Microtomografía	42
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43



5. JUSTIFICACIÓN	44
6. HIPÓTESIS	46
7. OBJETIVOS	47
7.1. General	47
7.2. Específicos	47
8. METODOLOGÍA	48
8.1. Material	48
8.2. Método	49
8.3. Tipo de estudio	53
8.4. Población de estudio	53
8.5. Muestra	53
8.6. Criterios de inclusión	54
8.7. Criterios de exclusión	54
8.8. Criterios de eliminación	54
8.9. Variable independiente	54
8.10. Variable dependiente	54
8.11. Consideraciones éticas	54
9. RESULTADOS	56
10. DISCUSIÓN	60
11. CONCLUSIONES	63
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64



RESUMEN

Durante la última década, el campo de la bioingeniería de tejidos ha tenido gran auge debido a los nuevos materiales desarrollados gracias al estudio e invención de materiales destinados a la sustitución y regeneración de tejidos y órganos que han sido dañados, mutilados o que simplemente se carecen de ellos; uno de esos materiales es el PLA (poliácido láctico) material que se ha comprobado es biocompatible y biodegradable.

El presente trabajo muestra la evaluación de la regeneración ósea mediante el uso de biomatrices nano fibrilares de PLA al 7% y 10% con células osteoblásticas para la regeneración *in vivo* de tejido óseo en modelo de calvaria de rata mediante el uso de microtomografía computarizada.

Los sujetos de estudios fueron ratas *Wistar* (N=12) divididas en 4 grupos con 3 ratas en cada uno, el grupo control con defecto, grupo 1 experimental con biomatriz de PLA exclusivamente, grupo 2 experimental con PLA al 7% adicionado con células osteoblásticas, y grupo 3 experimental con PLA al 10% adicionado con células osteoblásticas.

Esta investigación es de tipo experimental, prospectivo y longitudinal utilizando el modelo de calvaria de rata para este estudio, se operaron correspondientemente a cada grupo y se evaluó la regeneración del defecto mediante el uso de microtomografía computarizada *in vivo* a una semana, 1 mes, 3 meses y 4 meses para cada grupo, las mediciones se realizaron a través del software OSIRIX y se reportaron los resultados en tablas comparativas.

En los resultados se obtuvo una regeneración ósea del defecto de aproximadamente el 80% con el andamio de PLA al 7% adicionado con células osteoblásticas contra un 65% obtenido por el andamio de PLA al 10% con células osteoblásticas en su superficie



a comparación del control que fue del 21% al día 120 de evolución. Mediante al microtomografía computarizada se observó una densidad ósea similar al hueso parietal de la rata en la zona del defecto.



ABSTRACT

In the last decade the field of tissue bioengineering has had an upgrade because of development of new materials through to the study and invention of materials for the replacement and regeneration of tissues and organs that have been damaged, mutilated or simply lacking. One of these material is the PLA (polylactic acid) material that has been proven to be a biocompatible and biodegradable.

This work shows the evaluation of bone regeneration using nanofibrillary biomatrices of PLA at 7% and 10% with osteoblastic cells for regeneration *in vivo* in rat calvarial model using computed microtomography.

Study subjects were *Wistar* rats (N=12) divided into 4 groups with 3 rats in each one, control group just with defect, experimental group 1 with defect and PLA biomatrix at 10% only, experimental group 2 with defect and PLA biomatrix at 7% plus osteoblastic cell, and experimental group 3 with defect and PLA biomatrix at 10% plus osteoblastic cells.

This study is experimental, prospective and longitudinal type using the rat critical size calvarial defect, each group was operated correspondingly and the regeneration percent of the defect was evaluated by using computed microtomography *in vivo* at 7 days, 1 month, 3 months and 4 months using the measurements made with OSIRIX software. The results were reported using comparative tables from bone regeneration percent.

A defect regeneration of almost 80% was obtained with the 7% PLA scaffold with osteoblastic cells, 65% with the 10% PLA scaffold plus osteoblastic cells in comparative of the 21% obtained with the control group at day 120 of the evolution. By computerized microtomography was observed a bone density similar to the parietal bone of the rat in the graft area.



INTRODUCCIÓN

En la actualidad en la población se ha registrado un alza en la aparición de enfermedades metabólicas, neoplásicas o procesos inflamatorios crónicos que afectan la salud general de los pacientes. Particularmente, la salud buco dental se ha visto perjudicada por patologías como enfermedad periodontal, resorciones óseas resultado de traumatismos o de tumores, alteraciones metabólicas que tienen repercusión en las estructuras óseas de la cavidad oral.

La necesidad de restaurar la salud y los defectos generados por estas patologías ha llevado al uso de aloinjertos, xenoinjertos y sustitutos óseos sintéticos, cada uno de estas opciones presenta sus ventajas y desventajas, logrando algunos de estos la regeneración ósea que es la restitución de los tejidos íntegramente y algunos de manera cicatrizal donde el tejido que se toma es diferentes al original.

En este campo la bioingeniería en tejidos ha permitido desarrollar biomatrices que funcionan como andamios que imitan a la matriz ósea y facilitan el restablecimiento de la funcionalidad tisular.

El andamio es el factor que otorgara un carácter osteoconductor, a través de poros interconectados que en combinación con células sembradas facilita e induce la migración celular, así como el transporte de oxígeno y nutrientes a la zona afectada. Estos andamios se han diseñado basados en materiales naturales y sintéticos, de este último tipo, el PLA (ácido poliláctico) destaca por su biocompatibilidad, bajo costo, fácil manipulación, tiene un tiempo de reabsorción completo de 6 a 12 meses, es estable y altamente poroso, además es una barrera selectiva al impedir la migración de fibroblastos, al ser una lámina oclusiva con una matriz fibrosa que mejora el crecimiento del tejido conectivo e inhibe la migración apical del epitelio permitiendo el paso de células osteoprogenitoras.



En este proyecto se planteó la posibilidad del uso de biomatrices de PLA al 7% y 10% sembradas con células osteoblásticas para la regeneración ósea, por tal motivo se llevó al modelo de defecto crítico en calvaria de rata para su estudio mediante la microtomografía computarizada *in vivo* en ratas *Wistar*.

ANTECEDENTES

La mayor parte de la población en el mundo y particularmente, la sociedad mexicana sufren periodontitis que involucra pérdida de tejido óseo en zonas de ambos maxilares y con ello la pérdida de los tejidos de soporte del diente como son: el hueso alveolar, el cemento radicular, el ligamento periodontal y la encía, tal como se observa en la figura 1. Todo esto, es parte de la preocupación de la investigación en el área odontológica actual, pues día a día se buscan nuevas alternativas de tratamientos para recuperar estos tejidos, ya que las terapias que se han realizado en las últimas décadas en la clínica resultan deficientes.

Entre estas terapias de regeneración existen diferentes métodos que incluyen los injertos de tejidos blandos, injertos óseos, modificaciones de la superficie radicular, regeneración tisular guiada (RTG)/ regeneración ósea guiada (ROG), etc. Sin embargo todos dependen de los injertos autógenos, aloinjertos y xenoinjertos que se consideran el "patrón de oro", el cual presenta varios inconvenientes como el necesitar una etapa quirúrgica adicional, que causa morbilidad del sitio donante, suministro insuficiente, y la transmisión de enfermedades, que en conjunto limitan su utilidad clínica.¹



Figura 1. A. Periodonto reducido. B. Pérdida ósea vertical.

Fuente: scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0719-01072010000200007&script=sci_arttext



La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario, que para sus estudios se vale de tres agentes principales: la fuente celular, el andamio, y las biomoléculas y/o biominerales; que al conjugarse se puedan diseñar o crear constructos que nos permitan restaurar los tejidos perdidos, con una calidad, funcionalidad y estética lo más natural posible. Por ello; la ingeniería de tejidos busca diseñar andamios que imiten las estructuras naturales y una estructura que toma relevancia para entender los procesos de regeneración es la matriz extracelular de los tejidos del cuerpo humano. ²

Un aspecto fundamental en la ingeniería de tejido óseo consiste en la capacidad de reproducir la complejidad estructural y fisicoquímica de la matriz extracelular del hueso, dado por la combinación de proteínas y polisacáridos que se encuentran altamente integrados en los cristales de apatita y organizados de forma rígida de acuerdo a una arquitectura altamente jerárquica. En virtud de estas propiedades, la matriz ósea contribuye sustancialmente a las propiedades estructurales del tejido, e interviene activamente en los mecanismos de señalización celular por mecanismos cross-talk, generalmente mediada por la propia matriz extracelular, a través de la regulación de interacciones específicas en la escala nano, micro y macromolecular. Esto hace necesario que sea esencial diseñar un andamio que pueda crear un entorno favorable para las células a través de presentar una estructura tridimensional, con poros interconectados que puedan promover no sólo el crecimiento celular sino también permitir todos los mecanismos básicos por ejemplo: la adhesión, la migración, la proliferación y por último la diferenciación celular con la consiguiente mineralización de la matriz involucrados en el proceso de la osteogénesis en terapias de regeneración ósea. En los últimos años, la creciente sinergia entre médicos, biólogos e ingenieros en materiales ha permitido identificar diferentes soluciones tecnológicas orientadas a la creación de andamios que puedan imitar la química y la complejidad estructural de la matriz extracelular del hueso. ²

Una de las soluciones tecnológicas que ha tomado relevancia en el campo de la medicina regenerativa es la técnica de electrohilado o electrospinning por sus siglas en



ingles. El electrohilado, hoy representa una de las estrategias para la preparación de matrices poliméricas y/o de materiales compuestos de gran interés en la medicina regenerativa para la construcción de andamios para su uso como análogos de la matriz extracelular de los tejidos del cuerpo humano y con mayor énfasis se aplica en el tejido óseo.^{2,3} Esto debido a que a través de una arquitectura micro y nanofibrilar; un andamio polimérico sintetizado por la técnica de electrohilado permite imitar la organización espacial de las fibras de colágeno presente en la matriz extracelular ósea debido a que las membranas hiladas adquieren nuevas propiedades físico-químicas y de topografía superficial que son de vital importancia para la proliferación celular, presentan una interconexión de poros y una alta reactividad volumen/superficie importante para la interacción de las células con la superficie incrementando la adhesión celular y facilitando el transporte de nutrientes; presentan una gran resistencia, no causan reacciones inmunogénicas; son biorreabsorbible y biodegradables y si esta matriz polimérica es funcionalizada por biopolímeros (por ejemplo, la gelatina, un derivado de la proteína colágena) y/o fases bioactivos (es decir, fosfatos de calcio a manera de hidroxiapatita), podría permitir modular las propiedades funcionales del andamio en relación con la respuesta biológica que requiere la aplicación en la medicina regenerativa de tejidos mineralizados.⁴

Actualmente se conoce el papel crucial de las biomatrices, las cuales reacondicionan los microambientes de las células, proporcionando una matriz para adherirse y expandirse, así como aumentar la renovación celular y la diferenciación. Entre los diversos tipos de biomatrices que son utilizados en el tratamiento de regeneración, los materiales aloplásticos están tomando una alta relevancia en las terapias ya que al ser degradado por el cuerpo sus desechos no son tóxicos, además de no tener riesgo en transmisión de enfermedades.^{3,4}

Entre los materiales aloplásticos; el ácido poliláctico (PLA) es un polímero de ácido láctico con un alta biocompatibilidad. En el cuerpo humano el PLA se hidroliza en sus constituyentes, en ácido alfa hidroxil el cual es incorporado al ciclo de ácidos



tricarboxílicos y es excretado a manera de CO₂ y agua. Por ende, las biomatrices basadas en polímeros de PLA han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) con aplicación biomédica y en terapias de regeneración tisular.⁵

El PLA es un poliéster termoplástico que existe en dos formas estereoisómeras que dan lugar a tres polímeros morfológicamente diferentes y con distintas propiedades: dos polímeros estéreo regulares, ácido L- poliláctico (PLLA) y ácido D-poliláctico (PDLA) y la forma racémica ácido D, L- poliláctico (PDLLA). Siendo los primeros semicristalinos y el último amorfo. El PLA tiene propiedades en su estado amorfo cristalino que se logran manipulando la mezcla de los isómeros D y L, los pesos moleculares y la copolimerización del mismo. El lactato de forma cristalina compuesta de alto peso molecular mayor de (100 Da) tiene una reabsorción de uno a dos años. Sin embargo, las formulas diferentes al momento de su procesado modifican la velocidad de absorción. La degradación y la reabsorción dependen del peso molecular, cristalinidad, suministro sanguíneo, historia térmica, porosidad, geometría y área de interacción con los tejidos. El PLA tiene resistencia a la tensión y baja elongación que lo hace adecuado para soportar cargas mecánicas muy altas. A medida que el peso molecular aumenta las propiedades mecánicas y térmicas aumentan.^{5,6}

En la ingeniería de tejidos se han utilizado películas delgadas de PLA en la cual se ha reportado que es una membrana reabsorbible que en procesos de regeneración tisular guiada se ha observado su potencial de regeneración en animales y humanos en defectos de furca clase II. De manera importante las películas delgadas de PLA utilizada para RTG/ROG, han demostrado histológicamente *in vivo* en calvaria de ratas que se reabsorbe hasta los 12 meses sin causar ningún efecto de inflamación y/o rechazo.^{7,8}

Por otro lado, una matriz de PLA con óxido de silicato y óxido de calcio (BIOGLASS) que constituyen un composite se ha utilizado como andamio combinado con cultivos

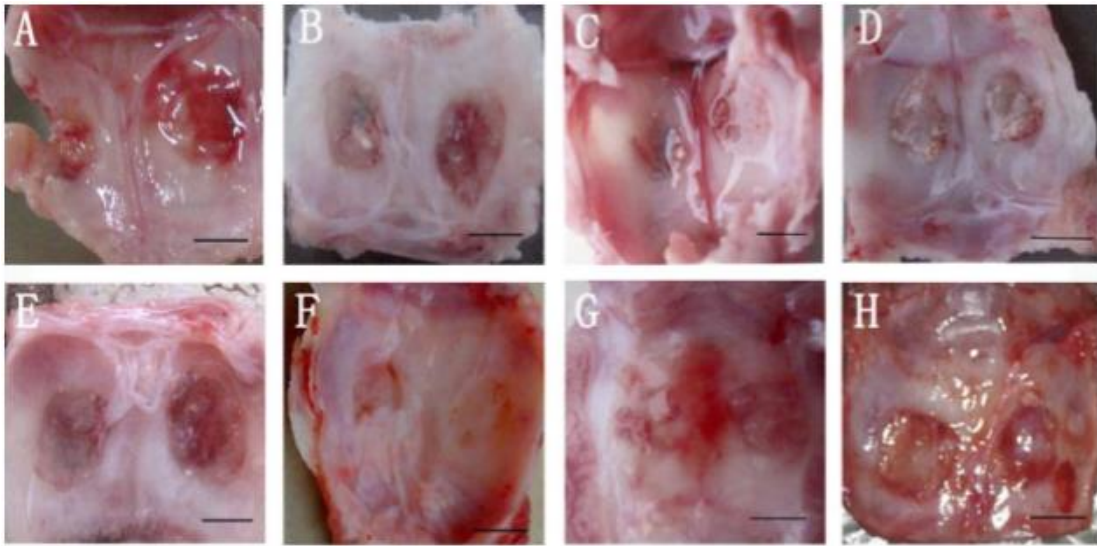


celulares de células mesenquimales y células endoteliales progenitoras que colocados en defectos de calvaria, promueven la formación ósea sin provocar daño a los órganos, reacciones inflamatorias sistémicas o formación de tumores.^{9,10}

El diseño de nano fibras también ha llevado a obtener resultados novedosos y en un estudio donde se sintetizaron nano fibras de PLA funcionalizadas con un factor de crecimiento como la BMP2, reportaron que facilitan la colonización de los defectos óseos e incrementan la regeneración *in vivo* debido a la combinación de la osteoconductividad que muestra el andamio con la habilidad de mantener un adecuado estímulo osteogénico.^{11,12}

Desde un punto de vista biológico, las perspectivas actuales y futuras para mejorar la regeneración de tejidos mineralizados en el área maxilofacial, sobretudo en la mandíbula, dependen de la capacidad de facilitar la repoblación de la herida por células capaces de promover la regeneración. Las células mesenquimales derivadas de tejidos dentales como las periodontales, pulpares y de encía; son células troncales mesenquimales multipotentes, que han empezado a ser usadas en una amplia variedad de terapias médicas en cirugía regenerativa, ya que se trata de una fuente celular accesible y que ha demostrado capacidades osteogénicas que se pueden usar como herramienta en nuevas terapias para la regeneración ósea; además para eludir el problema de la selección, multiplicación y diferenciación. La mayoría de los estudios realizados con células troncales mesenquimales las seleccionan, las reproducen *in vitro*, y luego les diferencian al linaje osteogénico a fin de optimizar estos nuevos tratamientos. El uso combinado de biomateriales en forma de andamios que imiten la matriz extracelular del hueso y células progenitoras de múltiples fuentes ha permitido a la ingeniería de tejidos la creación eficiente de sustitutos óseos; ya que los biomateriales presentan la ventaja de una disponibilidad ilimitada tienen buenas propiedades osteoconductoras, y aunque no son osteoinductivos, esta carencia se vería desvanecida con las células diferenciadas y/o con las biomatrices funcionalizadas. Por ello la propuesta de este trabajo, fue evaluar un constructo con biomatrices poliméricas

de PLA sembradas con células osteoblásticas, para lo cual se utilizó el modelo de defecto óseo crítico en la calvaria de rata como se ejemplifica en la figura 2, donde posteriormente se implantó el andamio de PLA a diferentes concentraciones, se utilizó la microtomografía *in vivo* para medir la cantidad de regeneración ósea lograda a diferentes lapsos de tiempo; con objeto de generar una terapia alternativa a las técnicas tradicionales empleando la ingeniería de tejidos.^{9,12}



*Figura 2. Vista macroscópica de calvaria de rata post-injertos.*⁵⁹



1. ENFERMEDAD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal es definida como un proceso infeccioso de la encía y del aparato de inserción adyacente, producido por diversos microorganismos que colonizan el área supra y subgingival. Esta enfermedad, a diferencia de la gingivitis, se caracteriza por una pérdida estructural del aparato de inserción, producida por determinadas bacterias, estas son también necesarias pero no suficientes para que se produzca la enfermedad, siendo necesaria la presencia de un hospedador susceptible. A nivel microscópico, las características que observamos son bolsas periodontales, localización de la unión epitelial apical a la línea amelocementaria, pérdida de fibras colágenas, elevada concentración de leucocitos polimorfonucleares en la unión y bolsa epitelial y migración del infiltrado celular inflamatorio hacia el tejido conectivo.¹³

CARACTERÍSTICAS

La periodontitis crónica tiene mayor prevalencia en adultos, aunque se pueden aparecer en individuos de cualquier grupo de edad, es decir, se produce tanto en la 1º como en la 2º dentición. Fig. 3.

Podemos llegar a hallar diversos signos y síntomas tales como:

- Edema.
- Eritema.
- Aumento o recesión de la encía.
- Placa o cálculo supra y subgingival.
- Factores locales que aumentan el acumulo de placa sangrado o supuración al sondaje o espontánea.
- Una mayor movilidad.
- Apiñamiento o exfoliación dental.



*Figura 3. Enfermedad periodontal crónica en adulto.
Fuente: www.buccasana.es/periodontitis-doctor-la-piorrea-se-cura/*

Todas estas circunstancias pueden afectar a un número variable de dientes en función de cada individuo, con tasas variables de progresión.^{13,14} Las características clínicas es una combinación de los siguientes signos: la pérdida de nivel de inserción clínica, aumento de la profundidad de bolsa, inflamación gingival y pérdida ósea radiográfica. Valorando dos de los parámetros más importantes, profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica, para clasificar la periodontitis crónica, se demuestra que: en el año 2000 se publican unos parámetros a partir de la clasificación del World Workshop de 1999, en el que otorgan a la periodontitis crónica de leve a moderada las siguientes características¹⁴: — Una pérdida de inserción que no supera un tercio de la longitud radicular. — Si el diente presentara lesión furcal, esta no superaría la clase I.

CLASIFICACIÓN

La clasificación de la periodontitis crónica e establece en función de los siguientes criterios:

1. Extensión:

- Localizada: La que se presenta en menos de un 30%.
- Generalizada: La que muestra en más de un 30% de localizaciones afectadas.

2. Severidad:

- Leve: Cuando la pérdida de inserción es de 1 a 2 milímetros.
- Moderada: Cuando la pérdida de inserción es de 3 a 4 mm.
- Severa o avanzada: Cuando la pérdida de inserción es superior a 5 mm.

DIAGNÓSTICO

El examen del estado periodontal de un paciente incluye la valoración de una serie de pruebas diagnósticas, basadas en parámetros clínicos, como la evaluación clínica de la inflamación, el nivel de inserción (NI) y profundidad de sondaje (PS), lo cual se esquematiza en la figura 4, así como, parámetros radiográficos para estimar la pérdida ósea. Las limitaciones de este tipo de mediciones es la falta de información sobre las localizaciones que están desarrollando un proceso en actividad; ya que este tipo de pruebas solo indican la destrucción tisular acontecida.^{14,15}

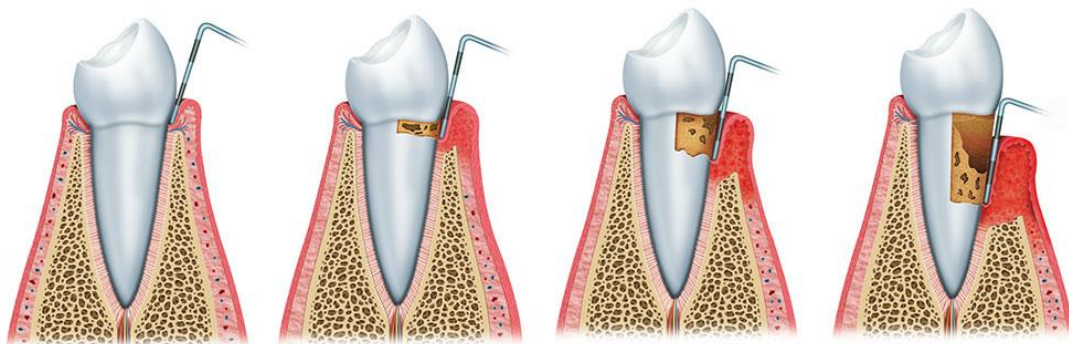


Figura 4. Niveles de inserción y pérdida ósea periodontal.
Fuente: <http://www.saludtotalcd.com/especialidades/periodoncia/>

ETIOPATOGENIA

En determinadas ocasiones, la enfermedad periodontal está relacionada con el sujeto, porque a pesar de la importancia de la placa en esta enfermedad, solo algunas personas desarrollan una destrucción avanzada, y su progresión es continua, con breves episodios de exacerbación y remisión localizados.^{15, 16} Por lo tanto, determinados



individuos con defectos en su sistema inflamatorio o inmunitario pueden generar periodontitis; incluso, se podría llegar a demostrar cierta predisposición genética.¹⁷

Denominamos infección periodontal a la enfermedad que, localizada en encía y estructuras de soporte del diente, ligamento y hueso alveolar, está producida por un grupo determinado de bacterias provenientes de la placa subgingival que funcionan normalmente individualmente o en biofilms, cuando se produce un desequilibrio entre la carga microbiana de la bolsa periodontal y los mecanismos locales y sistémicos de la respuesta del huésped.

El papel que desempeñan estas bacterias en dicho desequilibrio es el desarrollo de la periodontitis participando en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de un mecanismo inmunopatogénico.¹³ Offenbacher desarrolló un modelo etiopatogénico en el que la flora microbiana, al adquirir propiedades etiopatogénicas, permite al huésped ser capaz de frenar el proceso a través de las primeras líneas de defensa, con los PMN, confinando de ese modo la lesión a una gingivitis.¹⁵ Si esta fracasase, la penetración bacteriana daría lugar a la activación de la segunda línea de defensa del huésped mediante el eje linfocito-monocito y la liberación de diversos tipos de citoquinas y mediadores proinflamatorios que van a producir inflamación y destrucción de los tejidos, pérdida ósea y formación de bolsas periodontales, convirtiéndose en un proceso irreversible, periodontitis, que se detendrá cuando la flora patógena se modifique en flora normal y la relación de desequilibrio se establezca de nuevo.^{14, 15}

2. TÉCNICAS RECONSTRUCTIVAS PERIODONTALES

Las técnicas reconstructivas se subdividen en dos principales tipos: la nueva inserción sin injerto óseo y la nueva inserción con injerto óseo. Todas las técnicas recomendadas incluyen la eliminación cuidadosa y completa de todos los irritantes. El trauma por



oclusión, además de otros factores, puede alterar la cicatrización después del tratamiento de los tejidos periodontales de soporte, reduciendo la probabilidad de una nueva inserción. Por esto se indica el ajuste oclusivo, sí es necesario.

Los sustitutos biológicos pueden conceptualizarse como el uso de biomateriales metálicos, cerámicos o poliméricos; para lograr un aumento o reemplazo funcional de tejidos u órganos del cuerpo humano. Los biomateriales pueden ser agrupados en materiales bioinertes, los cuales no provocan ningún tipo de respuesta biológica o tienen una influencia muy pequeña en los tejidos vivos que los rodean y entre ellos encontramos a la alúmina o la zirconia. Los materiales bioactivos pueden enlazarse a los tejidos óseos vivos promoviendo la actividad celular y los más utilizados son la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico.^{18, 19}

Considerando que el hueso es un tejido vivo complejo que está compuesto por dos fases importantes, la búsqueda de materiales que cumplan con dicha complejidad aún está en desarrollo. El hueso en su fase inorgánica está compuesto por cristales de hidroxiapatita en conjunción con la fase orgánica que es una matriz compuesta de colágena de tipo I fibrilar.²⁰ Debido a esto, los sustitutos biológicos más utilizados para restaurar su función son los biomateriales bioactivos, debido a que mejoran las interacciones que existen entre las células osteoblásticas y la superficie del material de implante.

Actualmente, muchos grupos de investigación dirigen su estudio hacia la síntesis de biomateriales compuestos que imiten la estructura de la matriz extracelular del hueso y la evaluación de su aplicación en la ingeniería de tejido óseo.^{21, 23}

REGENERACIÓN TISULAR GUIADA (RTG)

La regeneración requiere la restitución de todo el periodonto perdido, para lograr este objetivo se hace necesario una migración selectiva de células derivadas del ligamento periodontal y el hueso alveolar.



Las células provenientes del ligamento tienen un alto nivel de actividad de la fosfatasa alcalina, y un gran potencial de diferenciación celular, así que estas células juegan un rol importante en la regeneración tisular. La adhesión de estas células y su migración depende de factores intrínsecos y factores extrínsecos, intrínsecos (cito esqueleto intracelular, componentes de la matriz extracelular), extrínsecos, sustrato al que se adhieren.^{21, 22}

Para la regeneración tisular guiada se debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Biocompatibilidad.
- Integración con los tejidos.
- Separación tisular.
- Mantenimiento del espacio.

La reconstrucción periodontal se logra sin el uso de injertos óseos en los defectos de tres paredes tratados de forma meticulosa (defectos intraóseos) y en los abscesos periodontales y endodónticos. Es más probable que haya nueva inserción cuando el proceso destructivo se da con rapidez, como después del tratamiento de las bolsas con complicaciones por abscesos periodontales y después del tratamiento de las lesiones ulcerativas necrosantes.²³

Se ha percibido la presencia del epitelio de unión y el epitelio de la bolsa como una barrera para el éxito del tratamiento, porque su presencia interfiere con la aposición directa del tejido conectivo y el cemento, limitando la altura a la que pueden insertarse las fibras periodontales en el cemento. Se han recomendado múltiples métodos para eliminar el epitelio de unión y el de la bolsa. Estos incluyen el curetaje, agentes químicos, métodos ultrasónicos, láser y técnicas quirúrgicas.²¹

La GTR incluye la colocación de barreras de diferentes tipos para cubrir el hueso y el ligamento periodontal, separándolos así, de manera temporal, del epitelio gingival. La exclusión de epitelio y el tejido conectivo gingival de la superficie radicular no sólo

evita la migración epitelial hacia la herida, sino que favorece la repoblación del área con células del ligamento periodontal y el hueso. Algunos reportes clínicos de caso mostraron resultado de la GTR en una ganancia en el nivel de inserción que no siempre se relaciona con una aposición del hueso alveolar. Fig. 5.



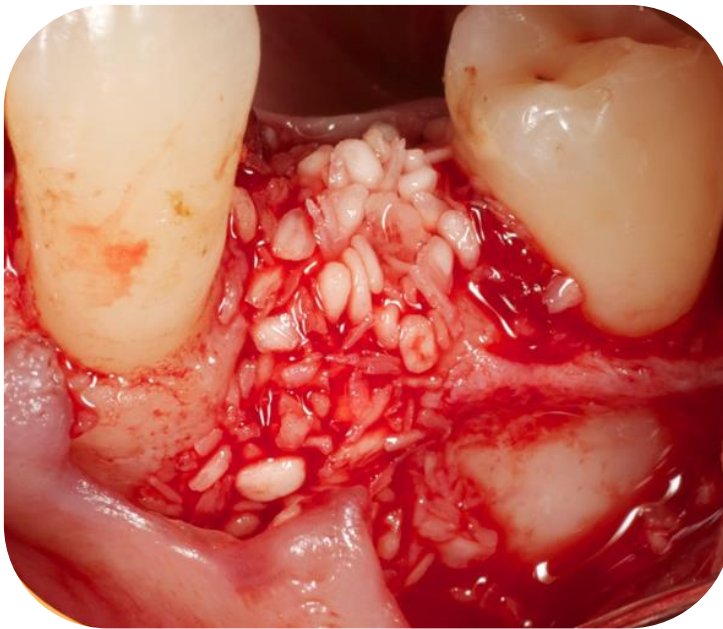
Figura 5. Regeneración ósea guiada. A. Separación del colgajo. B. Exposición del defecto. C. Colocación del injerto óseo. D. Reposicionamiento del colgajo y sutura.
Fuente: www.propdental.es/regeneracion-osea-guiada/regeneracion-periodontal-de-defectos-infraoseos/

El uso de membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) (material periodontal Gore-Tex, Flagstaff, Arizona) se ha probado en estudios clínicos controlados en furcaciones molares inferiores y han mostrado disminuciones estadísticamente significativas en las profundidades de las bolsas y una mejoría en los niveles de inserción seis meses después; las medidas del nivel óseo no han sido concluyentes.^{21, 23}

Las membranas que se desarrollaron en un principio eran no reabsorbibles y, por tanto, requerían un segundo, aunque solía ser simple, procedimiento para su retiro. Este segundo procedimiento se realizó durante las etapas iniciales de la cicatrización, por lo general tres a seis semanas después de la primera intervención. El segundo procedimiento fue un obstáculo importante en la utilización de esta técnica de GTR y,

por tanto, se desarrollaron membranas reabsorbibles. La membrana expandida de politetrafluoroetileno (PTFEe) (no reabsorbible) se obtiene en diferentes formas y tamaños para ajustarla a los espacios proximales y la superficie vestibular/lingual de las furcaciones.²²

TIPOS DE INJERTOS



El material que se injerta se obtiene del mismo individuo (autoinjertos), de un individuo diferente de la misma especie (aloinjertos) o de otras especies (xenoinjertos). Fig. 6.

Figura 6. Xenoinjerto óseo de dos paredes.

Fuente: www.propdental.es/regeneracion-osea-guiada/regeneracion-tisular-guiada-con-membrana/

Los materiales para los injertos óseos por lo general se evalúan con base en su potencial osteogénico, osteoinductivo u osteoconductor. La *ontogénesis* se refiere a la formación o desarrollo de nuevo hueso por parte de las células en el injerto. La *osteoinducción* es un proceso químico en que las moléculas del injerto (proteínas óseas morfo génicas) convierten las células vecinas en osteoblastos, lo que a su vez crea hueso. La *osteokonducción* es un defecto físico en que la matriz del injerto forma un andamio que favorece la penetración de células externas al injerto y la formación de hueso nuevo.²⁰



Schallhorn definió las consideraciones que determinan la selección de un material de la siguiente manera: capacidad de adaptación biológica, capacidad de predicción, factibilidad clínica riesgos operatorios mínimos, secuelas posoperatorias mínimas y aceptación del paciente. Es difícil encontrar un material con todas estas características, y hasta la fecha no hay un material o técnica ideal. ¹⁹

Todas las técnicas de injerto requieren un raspado pre quirúrgico, ajuste oclusivo como es necesario y la exposición del defecto con un colgajo de espesor total. La técnica del colgajo que mejor se adapta para propósitos de injerto es el colgajo de conservación de la papila, porque proporciona una cobertura completa del área interdental después de la sutura. Por lo general se recomienda el uso de antibióticos después del procedimiento. ²⁰

INJERTOS ÓSEOS AUTÓGENOS

El injerto óseo autólogo o autógeno consiste en la utilización de hueso obtenido a partir del mismo individuo a recibir el injerto. O sea, puede ser obtenido de los huesos no esenciales, como los de cresta ilíaca, o más comúnmente en cirugía oral y maxilofacial, de la sínfisis mandibular (área de la barbilla) o anterior rama de la mandibular (el proceso coronoides), en el cual se coloca un pequeño bloque de todo el hueso en el área que se está injertando. Cuando un injerto en bloque se llevará a cabo, el hueso autógeno es el más preferido porque hay menos riesgo de rechazo, ya que este se originó en el propio cuerpo del paciente. Un aspecto negativo de los injertos autólogos es que un sitio de la cirugía se requiere, en efecto, la adición de otro lugar potencial para el dolor postoperatorio y las complicaciones. ²²

El hueso autólogo es típicamente cosecha de intraorales de fuentes tales como las fuentes de la barbilla o extraoral, como la cresta ilíaca, el fíbula, las costillas, las partes e incluso la mandíbula. ¹⁹



Todo injerto óseo requiere un suministro de sangre en el sitio trasplantado. Según el lugar donde el sitio del trasplante sea y el tamaño del injerto, un suministro de sangre adicional podría ser requerido. Para estos tipos de injertos, la extracción de la parte del periostio y los vasos, se acompañan de sangre y hueso del donante. Este se conoce como un injerto de hueso vital.

ALOINJERTOS

El aloinjerto óseo, como el hueso autógeno, se deriva de los seres humanos, la diferencia es que el injerto se obtiene de una persona que no sea el que recibió el injerto. El aloinjerto óseo se toma de cadáveres durante las siguientes 12 horas después de la muerte del donador, se desgrasa, se corta en pedazos, se limpia con alcohol puro y se liofiliza. Después se puede desmineralizar el material, se tritura y después se tamiza a un tamaño de partículas de 250 a 750 μ m y se liofiliza. Por último, se sella al vacío en frascos de vidrio.²¹

Hay tres tipos de injerto de hueso disponible:

1. Fresh o hueso fresco congelado.
2. Freeze secado aloinjerto óseo (FDBA)
3. Hueso liofilizado desmineralizado aloinjerto (DFDBA)

Tanto los aloinjertos como los xenoinjertos son cuerpos extraños para el organismo y pueden provocar una respuesta inmune.

XENOINJERTOS

El sustituto óseo xenoinjerto tiene su origen en una especie distinta de humanos, como la bovina. Los xenoinjertos en general solo se distribuyen como una matriz calcificada.



SUSTITUTOS ÓSEOS

BIOCERÁMICOS

Tienen una excelente biocompatibilidad con los tejidos y no inducen una respuesta de cuerpo extraño. Estos materiales son osteoconductivos, no osteoinductivos, lo que significa que inducen la formación ósea cuando se colocan al lado de un hueso viable pero no cuando están rodeados de tejido que no forma hueso como la piel.²²

Se han usado dos tipos de cerámica de fosfato de calcio:

- Hidroxiapatita (HA) que tiene una proporción de calcio-fosfato de 1.67, similar a la del material óseo. La HA por lo general no es biorreabsorbible.
- Fosfato de tricalcio (TCP), con una proporción de calcio-fosfato de 1.5, a nivel mineralógico es una whitlockita-B. El TCP es por lo menos parcialmente biorreabsorbible.

CRISTALES BIOACTIVOS

Consta de sales de sodio y calcio, fosfatos y dióxido de sílice; para sus aplicaciones dentales, se utiliza en forma de partículas irregulares que miden de 90 a 170 μm , o de 300 a 355 μm . Cuando este material entra en contacto con los líquidos del tejido, las superficies de las partículas se recubren con hidroxicarbonato de apatita, incorpora proteínas orgánicas sólidas como el sulfato de condroitina y glucosaminoglicanos, y atrae osteoblastos que forman hueso con rapidez. Estos materiales bioactivos de vidrio también están encapsulados por colágena.¹⁸

MATERIALES DERIVADOS DEL CORAL

Se han usado dos materiales coralinos diferentes en la periodoncia clínica: el coral natural y la hidroxiapatita porosa derivada de coral. Ambos son biocompatibles, pero mientras que el coral natural se resorbe poco a poco (varios meses), la hidroxiapatita porosa no se resorbe o toma años en absorberse.¹⁹

USO DE MEMBRANAS Y ANDAMIOS EN LA REGENERACIÓN PERIODONTAL

Una barrera o membrana debe de tener las siguientes características:

- Biocompatibilidad.
- Evitar que tipos indeseables de células penetren, pero permitir el paso de nutrientes y gases.
- Integración tisular.
- Ser capaz de crear y mantener un espacio.
- Fácil de manipular.

Las barreras utilizadas en la regeneración tisular guiada, fig. 7, se clasifican en dos grandes grupos: *no reabsorbibles* y *reabsorbibles*.^{18,19}



Figura 7. Malla de polipropileno sobre defecto óseo vertical.
Fuente: www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=73200

MEMBRANA NO REASORBIBLE

Tienen la desventaja de que necesitan una segunda cirugía después de unas 4 o 6 semanas de realizarse la primera, la mayoría de esas barreras están compuestas por Politetrafluoroetileno (PTFE) y Politetrafluoroetileno Expandido (PTFEE). El primero es un polímero de fluorocarbono con grandes propiedades inertes y de biocompatibilidad, no poroso y no produce reacciones de cuerpo extraño. El segundo



es químicamente idéntico al primero y exhibe mínima reacción tisular inflamatoria en una variedad de tejidos, tiene microestructura porosa.^{6, 10}

Normalmente suelen dar mejores resultados ya que el efecto barrera es más duradero que con las reabsorbibles, actualmente se utilizan poco a pesar de sus buenos resultados ya que el único inconveniente es que se tiene que retirar la membrana en una segunda cirugía. Las desventajas es que el uso de las membranas no reabsorbibles es extremadamente sensible a la técnica, el material más caro, muchas veces se expone y contamina rápidamente y se necesita una segunda cirugía para eliminar la membrana.

10

MEMBRANA REABSORBIBLE

Evitan la necesidad de una segunda cirugía, reducen el riesgo de un trauma adicional, reduciéndose así los costos. Las membranas reabsorbibles pueden ser de origen natural o sintético.⁶

Se clasifican en dos tipos:

- Las hechas con polímeros sintéticos: Como por ejemplo Atrisorb, compuesta por ácido poliláctico.
- Las hechas con materiales naturales: Entre las que destacan las membranas de colágeno tipo I, las de sulfato cálcico y las de proteínas del esmalte. Las membranas colágeno tipo I mantienen sus funciones durante semanas. Los motivos por los que usar este material son muchos, entre ellos cabe mencionar:

1. *La biocompatibilidad*: el colágeno es un producto natural que posee una degradación enzimática. Promueve la adhesión, la migración y la proliferación celular.

2. *Hemostático*: facilita la agregación de las plaquetas, facilitando el cierre y cicatrización de las heridas.



3. *Actúa como barrera:* Provee el espacio e impide el paso de células epiteliales, además actúa como una barrera semipermeable, permitiendo la entrada de nutrientes y el intercambio de gases.

4. *Es un material químico táctico:* Atrae a los fibroblastos.

Las membranas de colágeno están indicadas para regeneración de defectos horizontales y verticales de las crestas alveolares, en fenestraciones óseas asociadas a colocaciones de implantes dentales, y para cubrir el hueso en caso de implantes inmediatos.⁹

Las desventajas de las membranas reabsorbibles son su corto periodo de degradación, la pérdida de estabilidad, y en ocasiones las reacciones inflamatorias asociadas a la degradación de la membrana y la pérdida de rigidez.

Las contraindicaciones de las membranas reabsorbibles son las siguientes:

- Si hay infección activa en la zona de inserción de la membrana.
- Cuando el paciente tiene una mala higiene bucodental.
- Paciente fumador.
- En caso de inflamaciones agudas del tejido.^{6,9 10}

ANDAMIOS TRIDIMENSIONALES

La formación de tejido producida por la implantación de células está fuertemente influenciada por el andamio sobre el cual se depositan. A menudo se utiliza un andamio de material biodegradable por lo que todos los materiales implantados desaparecerán, dejando tras de sí sólo las células implantadas. El diseño del andamio es una parte fundamental en la ingeniería de tejidos este debe contar con propiedades estructurales y funcionales, que produzcan señales bioquímicas y biofísicas que puedan simular el bio-ambiente espacial y temporal de la matriz extracelular y ser capaces de guiar a las células y brindar un soporte mecánico adecuado⁶. La química del andamio promueve la migración celular a través de señales que atraerán a las células que vienen de los



tejidos vecinos. Sin embargo, para que este fenómeno se pueda producir el andamio debe tener canales y porosidad hechos a la medida para que las células puedan adherirse, migrar y puedan cumplir con sus actividades metabólicas. Para actuar como un simulador de matriz extracelular el andamio debe tener una configuración en tres dimensiones, a nivel micro y nanométrico, es esencial una porosidad regulada que permita la difusión de nutrientes y desechos celulares, así como la neo-formación vascular, en este contexto varias tecnologías han surgido para de una manera controlada imprimir este patrón de poros específico de polímeros que promuevan la formación ósea.²⁴

Hoy en día, el incremento actual de la nanotecnología con procedimientos como electrohilado se ha adoptado como una técnica para producir andamios tridimensionales para aplicaciones biomédicas tales como la curación de heridas, ingeniería de tejidos y administración de fármacos.^{6, 24}

ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA)

La polimerización del ácido láctico da lugar a polímeros de ácido poliláctico (PLA) que, con otras moléculas poliméricas naturales, permiten la obtención de productos reabsorbibles y biodegradables. Entre los materiales plásticos biodegradables, el PLA es uno de los de mayor potencial para sustituir a los plásticos convencionales por sus excelentes propiedades físicas y mecánicas y porque puede procesarse utilizando las maquinarias existentes con sólo ajustes menores.¹⁶

El PLA posee baja toxicidad y una cinética de biodegradación predecible. A pesar de ser un material biocompatible por sí mismo, no posee un potencial bioactivo por lo que su superficie no es la más adecuada para la adhesión y proliferación celular.

Los polímeros de PLA son totalmente composteables en las instalaciones existentes. Con equipamiento apropiado, se puede convertir de nuevo en monómero, que puede ser convertido nuevamente en polímero. Como alternativa, puede biodegradarse en

agua, dióxido de carbono y material orgánico. Al final del ciclo de vida de un producto basado en PLA, éste puede descomponerse en sus partes más simples de manera que no quede ninguna señal del producto original.¹²

PROPIEDADES DEL ÁCIDO POLILÁCTICO

Además de su capacidad para biodegradarse, el PLA tiene propiedades que comparan favorablemente con la de los plásticos comúnmente empleados, por ejemplo, para envolturas. Esto es un factor importante pues permite sustituir por PLA a polímeros de la petroquímica sin necesidad de rediseñar productos o ejecutar grandes inversiones en nuevos equipos de proceso.^{10, 19}

El PLA se puede formular para ser tanto rígido como flexible y copolimerizarse con otros materiales; también producirse con propiedades mecánicas apropiadas para procesos de fabricación específicos como moldeo de inyección, extrusión de lámina, moldeo por soplado, termoformación, formación de películas, hilado y andamios, como los que se pueden observar en la figura 8, lo cual se logra con la mayoría de las técnicas y equipos convencionales, el PLA se clasifica como GRAS (generalmente como seguro) por la Food and Drug Administration de Estados Unidos.

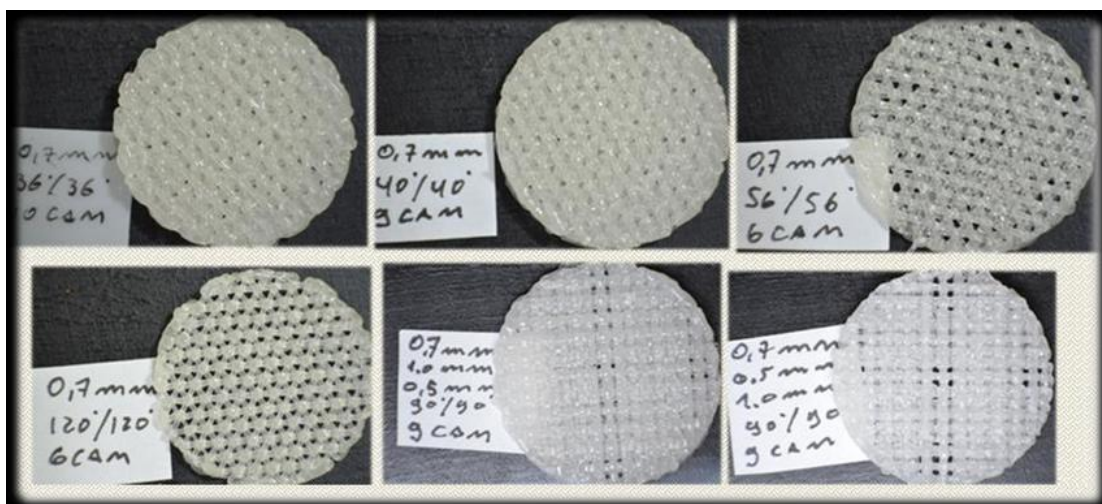


Figura 8. Andamios de PLA a diferentes concentraciones y distintas porosidades.

Fuente: [/www.researchgate.net/figure/Figura-18-Fotografia-de-los-andamios-construidos-mediante-FDM-siguiendo-las_fig15_317003912](http://www.researchgate.net/figure/Figura-18-Fotografia-de-los-andamios-construidos-mediante-FDM-siguiendo-las_fig15_317003912)



USOS

Por ser biodegradables y reabsorbible el PLA encuentra múltiples aplicaciones en medicina y en industrias como la alimentaria, la textil, de cosméticos y otras.

USO MÉDICO

Al poder ser asimilado por el cuerpo, ha encontrado múltiples aplicaciones en cirugía, ortopedia, ortodoncia, oftalmología, traumatología y otras ramas de la medicina y como soporte para el suministro controlado de numerosos medicamentos. Los siguientes son algunos de los usos en este campo: ¹³

- Estructuras biodegradables para la ingeniería de tejidos.
- Implantes reconstructivos y bioabsorbibles.
- Equipos e instrumental para cirujano.
- Implantes para fijación de fracturas.
- Tratamiento de la lipoatrofia de la cara.
- Placas absorbibles para fijación interna en fracturas de cara, cirugía ortognática y craneofacial.
- Preparación de microesferas biodegradables.
- Dispositivos bioabsorbibles de fijación en reconstrucciones orbitarias.
- Administración intravítrea de antivíricos.

3. OSTEOBLASTOS

El hueso es un tejido formado por varios tipos de células entre ellas los osteoblastos, estos son células grandes, entre 20-30 μm , tienen forma poliédrica, presentan un citoplasma basófilo, además de un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. ²⁵ Derivan de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares. ²⁶

Estos osteoblastos, emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que, a su vez, comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos, comunicándose entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan entre células o entre una célula



y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la conexina 43.²⁷

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. En la actualidad, se sabe que sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina, median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas sintetizan factores de crecimiento.²⁸

Los osteoblastos tienen una vida media de 1 a 10 semanas, en humanos, al término de este lapso pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos en un 15 % de los casos.²⁹ Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración. Las células limitantes son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin apenas organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina, y fosfatasa alcalina así como el receptor de parathormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo.³⁰

Una lesión en los huesos maxilares, se recupera siguiendo las etapas del proceso de cicatrización del hueso intramembranoso, es decir, formación de hueso sobre las membranas de tejido conectivo fibroso, a partir del mesénquima sin pasar por una etapa cartilaginosa.²⁶

Existen 3 mecanismos de control este proceso de osificación:

Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. De igual modo en este proceso será fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización. Se trata de un constante proceso de remodelación ósea que sucede durante toda la vida.

Ante un daño que fragmenta la continuidad del hueso y como solución a ello se implanta un biomaterial, este debe actuar como estímulo biológico para la especialización celular propio del tejido óseo; es decir que logra la *osteoinducción*. Se indica un biomaterial osteoinductivo mientras menor número de paredes óseas tenga el defecto óseo.^{26, 31}

En la *osteoconducción* el biomaterial proporciona un andamio o scaffold en el que se depositan las células progenitoras y todo tiene lugar toda la bioquímica necesaria para el crecimiento óseo y mineralización de la matriz ósea. En el caso de los andamios tridimensionales su función es decisiva en esta fase; mientras que las membranas logran este propósito siempre que sean porosas de forma tal que en dichos poros logren adherirse las células y comenzar desde allí la siguiente etapa.^{26,28, 32} Fig. 9.

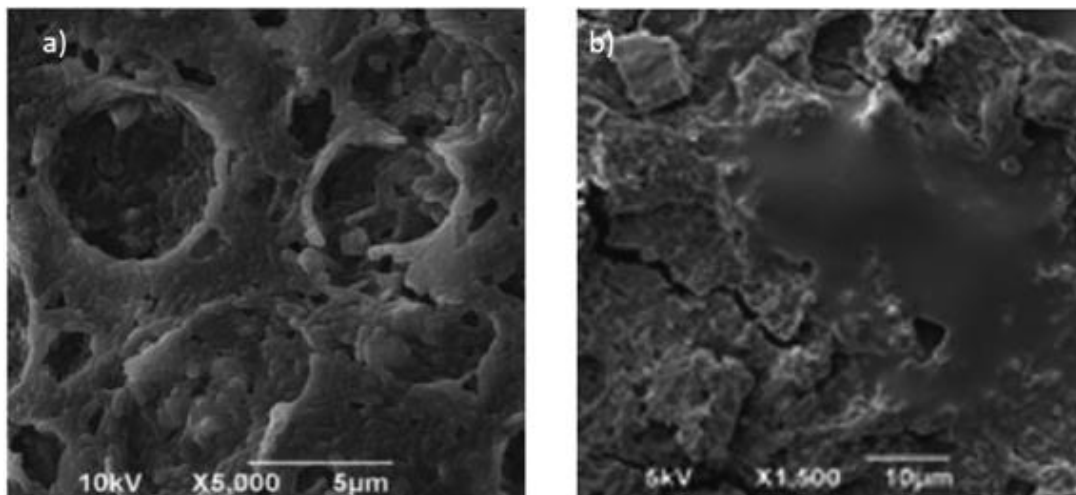


Figura 9. Microscopía electrónica de barrido. A. andamio de PLA sin células osteoblásticas B. PLA con células osteoblásticas en su superficie

Fuente: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-100X2014000200002



En la *osteogénesis*, la deposición de nuevo hueso por parte de estas células osteogénicas se da después de la osteoconducción, y generalmente es un proceso donde solo participa el organismo no tiene tanto protagonismo el biomaterial. Sin embargo, hay biomateriales que histológicamente han demostrado estimular la osteogénesis, tal como es el caso del plasma rico en plaquetas. Existen dos tipos de osteogénesis: osteogénesis a distancia y osteogénesis de contacto. En la primera, el tejido óseo se forma desde la superficie del hueso circundante. En la segunda, la formación de tejido óseo se produce desde la superficie del implante.^{26,27, 31}

4. IMPLANTES DENTALES

En la década de 1960 Branemark, introdujo el término oseointegración para referirse a la aceptación y anclaje de piezas de titanio colocadas en el hueso maxilar, actualmente conocidas como implantes dentales.^{33, 34} La oseointegración se define como la conexión firme, estable y duradera entre un implante sujeto a carga y el hueso que lo rodea. El éxito de esta conexión o interfase hueso-implante depende de factores biológicos y sistémicos del paciente y de las características del implante y su superficie, entre otros.^{35,36} Una adecuada oseointegración está sujeta a la aceptación del implante por parte de los tejidos vivos sin la formación de tejido fibroso en la interfase hueso-implante y sin la presencia de síntomas de inflamación severa.³⁷

Por su parte, la interfase hueso-implante dental se caracteriza por las propiedades favorables al crecimiento y formación de nuevo hueso alveolar que posee el implante en su superficie y por el diseño del mismo, lo que le permite distribuir adecuadamente las cargas mecánicas ejercidas durante la masticación.³⁸ Por lo tanto, esta interfase debe considerarse como el resultado de la interacción de un conjunto de factores que modulan la respuesta biológica y que determinan el éxito de la oseointegración, entre los que se encuentran la respuesta inmune del paciente, el procedimiento de inserción,



las características fisiológicas del hueso receptor, los factores mecánicos del implante y su superficie y la acción de fuerzas mecánicas sobre el hueso y el implante.^{39, 40}

La calidad de hueso es importante en implantología dental debido a que representa un indicador de viabilidad para un tratamiento y procedimiento de inserción determinado. Por ejemplo, debido a la mayor densidad y menor porosidad del hueso cortical, las calidades de hueso 1 y 2 presentan mayor estabilidad y mayor anclaje tras la inserción del implante dental. Sin embargo, por su cercanía con la médula ósea y el tejido hematopoyético, el hueso trabecular requiere un menor tiempo de cicatrización respecto al hueso cortical.⁴¹ De acuerdo a esto puede entonces resultar más conveniente que el sitio de implantación tenga una calidad de hueso 3 ó 4. Esta dualidad entre estabilidad y tiempo de cicatrización ha permitido la aparición de nuevas técnicas de fabricación de implantes dentales y nuevos protocolos de inserción que mejoran la tasa y velocidad de cicatrización independiente de la calidad de hueso, con lo cual se impulsa el diseño de implantes oseointegrables destinados a ser usados en zonas con hueso mayoritariamente trabecular.⁴²

Estas características del hueso alveolar condicionan la interfase hueso-implante siempre que la formación de hueso constituye la esencia del éxito del implante. No obstante, aspectos más generales de la anatomía del hueso mandibular deben ser tenidos en cuenta durante la planeación de un tratamiento dental que incluya la inserción de un implante. Entre estos aspectos se cuenta las dimensiones de la mandíbula y el maxilar, el volumen de hueso necesario para que el implante sea exitoso, los espacios de manipulación que dispone el cirujano para la inserción del implante, la edad del paciente y su historial de posibles enfermedades óseas.⁴³ Adicionalmente, la adecuada selección del implante y el procedimiento de inserción determinan buena parte de las características de estabilidad y anclaje del hueso circundante y por lo tanto, la oseointegración de la interfase.⁴⁴

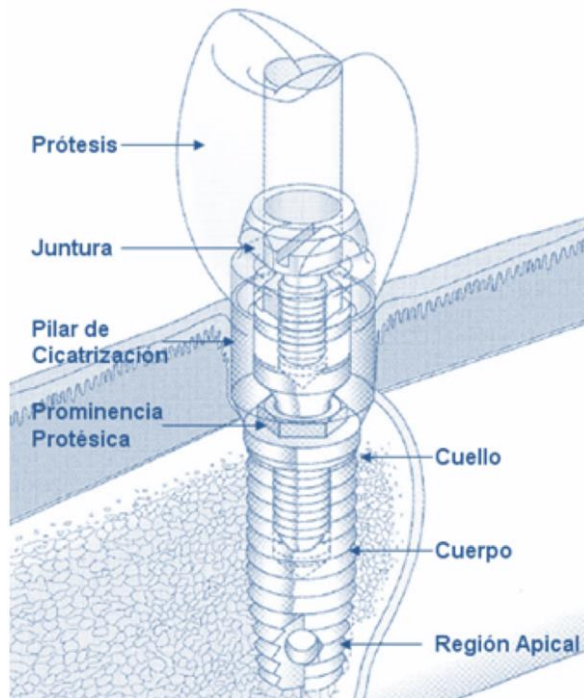


Figura 10. Características de un implante dental tipo screw-type.

Fuente: bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol28_3_09/ibi11309.htm

Un implante dental es una dispositivo hecho de un material biológicamente inerte que es insertado mediante cirugía en el hueso alveolar y que sustituye la raíz de un diente ausente. Hace parte de la unidad protésica que sustituye el diente por completo y que además del implante se compone del pilar protésico y la prótesis (figura 10).

Como el implante está en contacto únicamente con el tejido óseo, el pilar protésico prolonga el implante sobre los tejidos blandos (figura 10). Una cuarta pieza denominada juntura se encarga de unir el pilar protésico con la prótesis dental que hace las veces de corona dental. En general, la prótesis puede unirse al implante mediante una juntura atornillada o una juntura cementada. En la juntura atornillada (figura 10) se utiliza un tornillo para ajustar la prótesis mientras que en la juntura cementada se utilizan cementos dentales mejorados, provenientes de cementos dentales estándar usados en la práctica odontológica.³³

Existen diferentes tipos de implantes dentales, pero se destacan aquellos que tienen el cuerpo rugado y roscado, con dimensiones que varían en promedio entre los 6,0 - 16,0 mm de largo y 3.5 - 5.0 mm de diámetro. Sin embargo, la longitud y el diámetro óptimos necesarios para una implantación exitosa a largo plazo dependen de las condiciones de soporte del hueso residente, y los factores biológicos y mecánicos



asociados.⁴⁵ En la actualidad existen diferentes geometrías de implantes dentales pero la más difundida es la geometría tipo tornillo o screw-type introducida por Branemark gracias a que posee una alta retención mecánica dada por el cuerpo acanalado y una gran habilidad para transferir fuerzas compresivas al tiempo que mejora la estabilidad inicial.⁴³

En general, los implantes dentales son fabricados de titanio comercialmente puro [Ti.c.p.] debido a su comprobada biocompatibilidad, es decir, la aceptación por parte de los tejidos vivos. La biocompatibilidad se caracteriza por la ausencia de corrosión y deterioro del material que puede conducir a respuestas inflamatorias indeseables, muerte del tejido circundante o la formación de trombos por efectos de coagulación sanguínea inesperada. Implica además que el organismo no genere respuestas inmunológicas indeseadas como el aumento en el número de anticuerpos, y que no existan fenómenos de mutación celular o aparición de células cancerígenas. Para determinar la biocompatibilidad de un material se llevan a cabo pruebas experimentales *in vitro* usando cultivos celulares mediante las cuales se determina la toxicidad y solubilidad del material. Además, se realizan pruebas *in vivo* particularmente en modelos animales que mediante técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica, bioquímica, carga mecánica y microscopía electrónica permiten evaluar la respuesta de los tejidos vivos en presencia del material.⁴⁶

Varios estudios realizados para evaluar la biocompatibilidad de diferentes tipos de materiales han demostrado que el titanio es uno de los materiales que mejor respuesta presenta a la inserción en el organismo vivo gracias a su resistencia a la corrosión y su estabilidad mecánica durante la etapa de cicatrización. Se ha encontrado que el niobio, el tantalio y el zirconio son los materiales no tóxicos más favorables para ser usados con aleaciones de titanio en aplicaciones biomédicas, y que entre los biomateriales metálicos, la Biocompatibilidad de las aleaciones de titanio es la más elevada. Sin embargo, estas aleaciones no son bioactivas, es decir, no forman una unión fuerte con el tejido óseo. Un material es bioactivo si permite la colonización de su superficie por



parte de las células osteoprogenitoras. Una medida esta característica es la inmersión del material en un fluido que simula las condiciones corporales y determinando la formación de microcristales de hidroxiapatita. Por la necesidad de establecer uniones directas, adherentes y fuertes con el tejido óseo, los implantes dentales son provistos de tratamientos superficiales y recubrimientos con otros materiales que incrementan su desempeño al promover el crecimiento de hueso en su superficie.⁴⁰

Aunque la evaluación de las características anatómicas del hueso alveolar, la selección del implante y el uso de un protocolo de inserción cuidadoso están asociadas con el éxito de la interfase hueso-implante, su oseointegración depende en gran medida de la formación de hueso en la superficie del implante. En la siguiente sección se muestra como la superficie del implante está directamente relacionada con la formación y estabilidad del hueso circundante.³⁵

5. DEFECTO CRÍTICO EN CALVARIA DE RATAS

Los ensayos experimentales en modelos animales permiten por aproximación recabar datos y pruebas que permitan a futuro hacer intervenciones clínicas con hechos sustentables.⁴⁷

En cuanto a procesos de regeneración ósea el modelo animal en ratas presenta varias ventajas como fácil alojamiento, manipulación, mantenimiento, permite estandarizar condiciones experimentales en individuos genéticamente similares.⁴⁸

El defecto de tamaño crítico en calvaria de ratas es uno de los modelos experimentales más comúnmente utilizados para la evaluación de regeneración ósea. El término "tamaño de defecto crítico" ha sido originalmente definido por Schmitz y Hollinger (1986) como "el tamaño más pequeño de heridas intraóseas en especies particulares que no se cura espontáneamente durante el curso de la vida del animal".⁷ Este modelo tiene varias ventajas como la estandarización del

defecto, adecuado acceso quirúrgico, adecuado soporte de los materiales injertados por parte de la dura madre y la piel, pero posee algunas desventajas como no poder evaluar la cicatrización ósea bajo cargas biomecánicas. Existe basta evidencia que demuestra que este defecto mide 5 mm.⁴⁹

6. MICROTOMOGRAFÍA

La microtomografía es una modalidad de fuente de rayos X que se utiliza en el estudio de animales pequeños, y se emplea principalmente para observar imágenes de hueso debido a su alto contraste entre los tejidos calcificados y tejidos blandos. Los estudios de microtomografía proveen de imágenes de alta resolución de 50 micrones o menos en una rápida adquisición entre 5 a 30 minutos, además de ser un método no invasivo.⁵⁰

El microtomógrafo emite un haz muy fino de rayos X, este haz incide sobre el sujeto de estudio y parte de este lo atraviesa. La radiación que no ha sido absorbida por el sujeto, en forma de espectro, es recogida por los detectores. Luego el emisor del haz, cambia su posición, y vuelve a realizar el proceso anterior hasta abarcar todo el objeto. El ordenador transforma todos los datos recogidos por los detectores, en imágenes virtuales en tres dimensiones como se muestra en la figura 11.⁴⁹

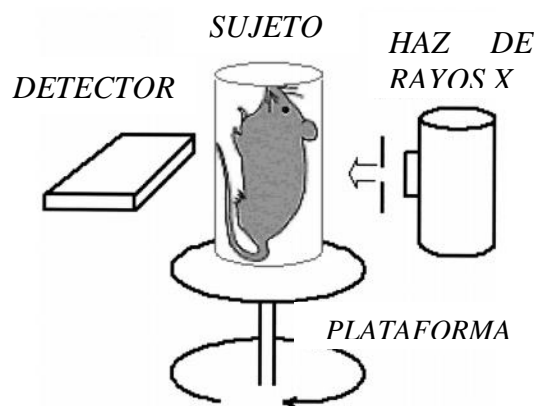


Figura 11. Esquema de microtomografía en roedor. El sujeto de estudio es colocado al entro y haz de rayos X es emitido en torno a él.⁴



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante los últimos años se ha estimado que de la población que acude a consulta odontológica presentando pérdida ósea en su mayoría es resultado de enfermedad periodontal, no obstante, existen trastornos y afecciones que pueden llegar a deformar y reabsorber áreas extensas de tejido óseo dentro de los maxilares. Por esta razón la odontología ha reunido sus esfuerzos en encontrar un material adecuado para propiciar una regeneración adecuada cualitativa y cuantitativamente, para devolver función y calidad de vida al paciente en menor tiempo y con mejores resultados.

Es por ello que se ha trabajado con diferentes tipos de injertos, tanto naturales como sintéticos en pro de mejorar y acelerar el crecimiento óseo de la zona manipulada, sin embargo, todo material presenta sus ventajas y desventajas por lo que el cuerpo de investigadores de la materia se han propuesto buscar optimizar estos resultados.

El xenoinjerto de PLA ha sido recientemente usado en ingeniería tisular gracias a su biocompatibilidad, estabilidad, baja toxicidad y otras características que lo hacen un gran andamio para la regeneración ósea. Tener un andamio adecuado provee de la capacidad osteoconductora ya que a través de poros interconectados y en combinación con células osteoinductoras sembradas facilita e induce la migración celular y además de transporte de oxígeno y nutrientes a la zona afectada

Es por ello que para esta investigación se plantea la posibilidad de que las biomatrices nanofibrilares de PLA fomenten la formación ósea *in vivo* de forma cuantitativa y cualitativa en defectos óseos críticos de calvaria de rata, y para ello también se observará el comportamiento de la regeneración lograda con la adición de células osteoblásticas.



JUSTIFICACIÓN

El problema de la sustitución y regeneración de los tejidos y órganos del cuerpo humano no se ha podido resolver de manera definitiva y óptima. El 35% de las fuentes económicas y humanas en el campo médico-científico están empeñadas en la solución de tal problema. Los recientes avances científicos y tecnológicos obtenidos en la ingeniería de tejidos consienten el afrontar el problema en una manera revolucionaria con una solución que se pueda aplicar en el futuro inmediato haciendo uso de la tecnología del diseño de andamios poliméricos hilados.

En los últimos años, la nanotecnología ha ofrecido estrategias para el diseño de andamios con características muy prometedoras para el área de la regeneración tisular. Entre las diferentes técnicas de elaboración y síntesis utilizadas para producir nano fibras, la tecnología de electrohilado está permitiendo la fabricación de fibras de decenas de nanómetros a decenas de micrómetros de diámetro, con una porosidad definida (densidad de la fibra) y un peso básico especificado (peso de fibra por área), sin poner en riesgo la salud del manipulador. Además esta técnica permite el desarrollo de una estructura en tres dimensiones de los materiales poliméricos para crear nano fibras que tienen un área de superficie muy grande, y nano fibras que pueden imitar la estructura de la matriz extracelular de los tejidos; con ello proporcionando apoyo al crecimiento celular.

En este proyecto se propuso el diseño de un andamio con arquitectura nano fibrilar sintetizado por la técnica de hilado para la realización de una matriz extracelular a base de polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA) que podría imitar la organización espacial de las fibras de colágeno presentes en la matriz extracelular ósea y al mismo tiempo si esta matriz polimérica es funcionalizada con fases bioactivas como podría permitir modular las propiedades funcionales del andamio en relación con la respuesta biológica que se requiere en la aplicación en el campo de la biomedicina regenerativa del tejido óseo.



Por ello, la contribución de esta propuesta de investigación radicó en que se desarrolló una estrategia (modelo animal en rata) para la optimización de las condiciones del proceso de fabricación de andamios poliméricos cuando son sometidos a procesos de regeneración ósea en defectos críticos de calvaria. Entendiendo como la morfología estructural del andamio, pudo modular altamente y funcionalmente la respuesta de células osteoblásticas, el cual nos llevará a la creación de prototipos con propiedades de reabsorción, físicamente estable, osteoconductor/osteoinductor que serían de utilidad en la clínica al biomimetizar la matriz extracelular del hueso integrándose y fomentando la formación de hueso en el reborde con defecto para implantes dentales y tratamiento de la enfermedad periodontal.



HIPÓTESIS

H₀₁

Las biomatrices nanofibrilares de PLA no fomentarán la regeneración ósea *in vivo*.

H_{a1}

Las biomatrices nanofibrilares de PLA fomentarán la regeneración ósea *in vivo*.

H₀₂

Los andamios de PLA adicionadas con células osteoblásticas no generaran en mayor porcentaje regeneración ósea *in vivo* que los andamios de PLA desprovistos de osteoblastos.

H_{a2}

Los andamios de PLA adicionadas con células osteoblásticas generaran en mayor porcentaje regeneración ósea *in vivo* que los andamios de PLA desprovistos de osteoblastos.

H₀₃

Los andamios de PLA al 7% son más efectivos en el potencial de regeneración ósea versus la membrana de PLA al 10%.

H_{a3}

Los andamios de PLA al 10% son más efectivos en el potencial de regeneración ósea versus la membrana de PLA al 7%.



OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la formación ósea y el comportamiento *in vivo* de un innovador constructo para regeneración de defecto crítico óseo.

ESPECÍFICOS

1. Determinar el tipo de formación ósea en los defectos de calvaria tratados con PLA funcionalizado con biominerales y con células osteoblásticas mediante microtomografía *in vivo*.
2. Evaluar el tejido mineral depositado por el software OSIRIX de los sitios tratados con PLA adicionado con células osteoblásticas en los defectos de calvaria de rata.
3. Comparar el porcentaje de regeneración ósea entre los materiales a diferentes concentraciones con y sin células osteoblásticas.



METODOLOGÍA

MATERIALES

Tabla 1. Instrumental, equipo, insumos, fármacos y elementos químicos empleados

Instrumental			
Mango de bisturí bard-parker #3	Hoja de bisturí #15	Pinzas Adson con dientes	Pinzas Adson sin dientes
Espátula 7A	Pinzas Mayo curvas	Tijeras para sutura	Jeringa tipo carpule
Pinzas para campo	Pinza portaagujas	Contraángulo quirúrgico para motor de implante	Trefina 9 mm diámetro interno
Equipo			
Microtomógrafo	Histoquinete	Microtomo	Motor quirúrgico W&H
Mesa de disección	Rasuradora eléctrica		
Insumos			
Guantes estériles	Cubrebocas	Gorro y bata desechable	Lentes de protección
Toallas desinfectantes	Campos desechables	Gasas estériles 5x5 cm	Jeringas hipodérmicas 5 ml
Solución fisiológica	Jabón quirúrgico	Sutura PGA ácido poliglicólico 4 ceros	Satín hemostático
Fármacos			
Yodopovidona	Mepivacaína al 35%	Clorhidrato de ketamina (Ketalin)	Glutaraldehido
Elementos químicos			
PLA al 7% previamente cortado al tamaño de defecto	PLA al 10 % previamente cortado al tamaño del defecto	Células osteoblasticas	



Tabla 2. Recursos humanos, animales e infraestructura utilizada.

Recursos Humanos	Dra. Janeth Serrano Bello (asesora)
	Mtro. Pedro López Reynoso (tutor)
	Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez
Recursos Animales	12 ratas macho cepa <i>Wistar</i>
Infraestructura	Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos DEPeI, UNAM
	Bioterio de la Facultad de Odontología DEPeI, UNAM
	Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio de Física Médica (INCan)

MÉTODO

A. OBTENCIÓN DE LA BIOMATRIZ DE PLA

Para este estudio, los andamios para este estudio fueron caracterizados previamente en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la DEPeI de la Facultad de Odontología, UNAM.

El proceso de elaboración de las membranas se llevó a cabo por disolver el PLA a concentraciones de 10% (peso/volumen) en cloroformo. Para diseñar y sintetizar las membranas las soluciones de cada grupo experimental fueron puestas en una jeringa con una aguja de diámetro de 0.3 mm con una velocidad de 0.04 ml. /h con una potencia de electrohilado de 15 Kv dirigido a un colector a una distancia de 15 cm para recolectar las fibras hiladas. Los andamios fueron sometidos a su caracterización fisicoquímica, superficial y de morfología por medio de las técnicas como MFA; MEB; rayos X; FTIR y TGA.

B. CULTIVO DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS

Las células osteoblásticas se expandieron en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPeI de la Facultad de Odontología, UNAM.



Las células osteoblásticas se mantuvieron en medio de cultivo alfa-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml), 2mm de glutamina y 50mm de aminoácidos no esenciales. Para la propuesta experimental fueron utilizados cultivos celulares en el 3er y 6to pasaje. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad.

C. REGENERACIÓN ÓSEA IN VIVO EN DEFECTOS CRANEALES DE TAMAÑO CRÍTICO DE RATA WISTAR

Para responder la pregunta de la propuesta y los objetivos se plantea la etapa *in vivo* donde se realizó la optimización del modelo animal, para el cual se diseñaron los siguientes grupos de estudio:

- Grupo control con defecto (n=3)
- Grupo 1 experimental con la biomatriz de PLA (n=3)
- Grupo 2 experimental con la biomatriz de PLA 7% provisto de las células osteoblásticas (n=3)
- Grupo 3 experimental con la biomatriz composite de PLA 10% junto con las células osteoblásticas (n=3)

En el modelo animal se utilizaron ratas macho, cepa *Wistar* de 18 semanas y peso 250 gramos. Dichas ratas se dividieron aleatoriamente en los grupos propuestos anteriormente siguiendo el parámetro de la norma oficial mexicana NOM-052-ZOO1999⁵¹; la cual describe las especificaciones técnicas, cuidados y uso de animales de laboratorio. Así como los procedimientos establecidos por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Para generar el defecto crítico en calvaria, los sujetos de estudio (ratas *Wistar*) fueron sedados y tranquilizados con Ketamina (80mg/kg) y Xilacina (10mg/kg), ambas por vía intramuscular. Se rasuró la zona quirúrgica y se realizó antisepsia de rutina con yodopovidona. Se aplicó anestesia en la zona quirúrgica utilizando mepivacaína con epinefrina al 2%, a continuación se realizó una incisión lineal de 3 cm a través de la piel y el periostio de la calota hasta exponer el vértice craneal. Para la realización del defecto de tamaño crítico, se utilizó una trefina de diámetro de 9 mm (tamaño del defecto), montada en un motor para implantes a 4,000 rpm. El defecto se delimitó con dicha trefina en la porción media del hueso frontal, irrigando con una solución amortiguadora salina de fosfatos estéril (PBS) y posteriormente con un cincel se realizó el clivaje del fragmento óseo con sumo cuidado de no dañar la duramadre. Por último; se lavó la zona con PBS estéril para remover cualquier reminiscencia de detritos de la operación quirúrgica, se tomó el andamio previamente cortado al tamaño y forma del defecto colocándolo por encima de la duramadre con la concentración y células correspondientes a cada grupo; para finalizar se situó sobre el andamio satén hemostático en forma de rectángulo cubriendo la totalidad del defecto.

Una vez logrado lo anterior los sujetos de estudio fueron distribuidos en los diferentes grupos propuestos previamente. Cabe señalar que el sitio quirúrgico fue cerrado con sutura de puntos simples con ácido poli-glicólico 4-0. Los sujetos de estudio (ratas *Wistar*) fueron alimentados con rodent diet 5001 ad libitum. Lo descrito anteriormente se observa en las figuras 12 a 19.

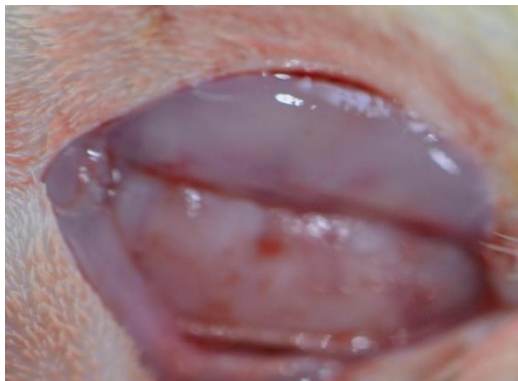


Figura 12.-corte óseo con trefina 9 mm.
Fuente Directa

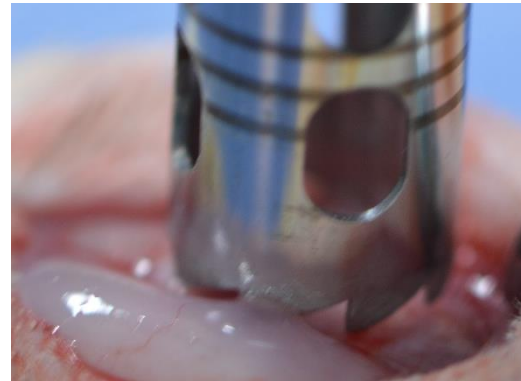


Figura 13.- Exposición de la calvaria de rata.
Fuente Directa



Figura 14.- Diámetro del defecto 9 mm.
Fuente Directa



Figura 15.- Defecto crítico calvaria de rata.
Fuente Directa



Figura 16.- Colocación de la matriz de PLA y células osteoblásticas.
Fuente Directa

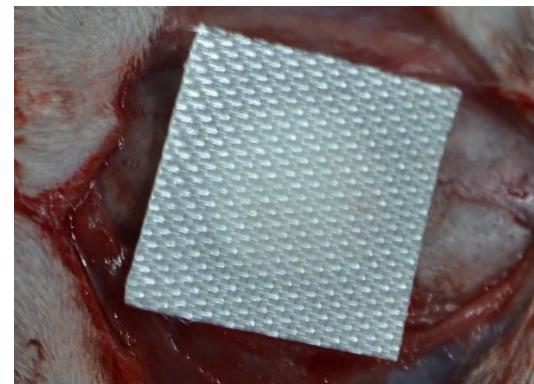


Figura 17.- Colocación de satín hemostático.
Fuente Directa

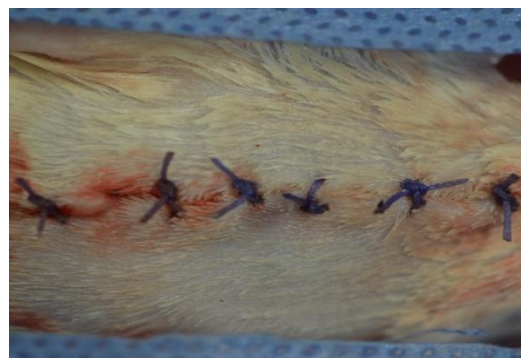


Figura 18.- Sutura de epitelio.
Fuente Directa

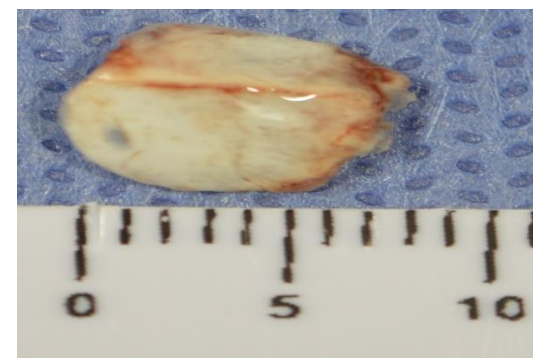


Figura 19.- Especimen de calvaria obtenido
Fuente Directa



D. EUTANASIA

El modelo de estudio se programó llevar a los tiempos de 7, 30, 90, 120 días post-cirugía. Para obtener las muestras de análisis del modelo propuesto; los sujetos de estudio (ratas *Wistar*) se sacrificaron mediante sobredosis de cloroformo hasta llegar al paro cardiorrespiratorio. Posteriormente; en la zona experimental (defecto crítico en calvaria) se realizaron las osteotomías de la zona la cual se realizó con pieza de baja rotación e irrigación constante con agua corriente. Se tuvo máximo cuidado de cortar la periferia del defecto con un margen de seguridad de 10 mm. Se lavó cuidadosamente las muestras y se colocaron en para formaldehído al 10% durante 48 h para su fijación y posterior análisis.

TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio se de tipo experimental, prospectivo y longitudinal.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

- Ratas cepa *Wistar* de 18 semanas de vida del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.
- 9 andamios nanofibrilares de PLA de 9mm de diámetro para su evaluación *in vivo*.

MUESTRA

- 12 Ratitas macho cepa *Wistar* 250 ± 5 gr, de 18 semanas de vida del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.
- 3 andamios nanofibrilares de PLA al 10% de 9mm de diámetro.
- 3 andamios nanofibrilares de PLA al 10% con células osteoblásticas de 9mm de diámetro.
- 3 andamios nanofibrilares de PLA al 7% con células osteoblásticas de 9mm de diámetro.



CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Ratas macho sanas cepa *Wistar* de 250 ± 5 gr de 18 semanas de vida.

Andamios de PLA al 7% y 10% cada uno sintetizado bajo las mismas condiciones y de la misma medida.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Ratas hembras.

Ratas enfermas y fuera del rango de peso y edad.

Andamios de PLA que no tuvieron la concentración requerida del material, ni diámetro de 9 mm.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Ratas que desarrollaron infección o alguna patología no involucrada con el desarrollo del estudio.

Andamios que fueron dañados en el procedimiento o debido a una mala técnica de esterilización.

VARIABLE INDEPENDIENTE

La concentración del andamio de PLA y la adhesión de células osteoblásticas a dichos andamios.

VARIABLE DEPENDIENTE

El grado de regeneración ósea.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para el desarrollo del presente estudio se respetaron los lineamientos establecidos en las siguientes Normas Oficiales de México, dentro las cuales se regulan el manejo y bienestar de los animales de laboratorio:



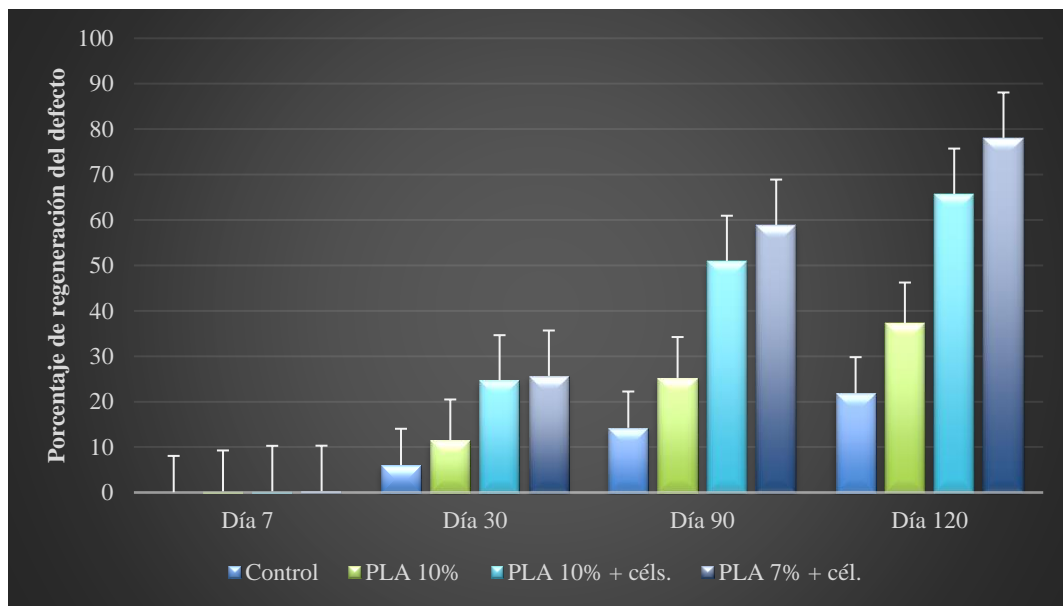
- NOM-062-ZOO1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.⁵¹
- NOM-029-ZOO-1995. Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoosanitaria.⁵²
- NOM-046-ZOO-1995. Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica.⁵³
- NOM-051-ZOO-1995. Trato humanitario en la movilización de animales.⁵⁴

Así mismo, los procedimientos establecidos por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la UNAM

RESULTADOS

Mediante el uso del software OSIRIX se realizó la reconstrucción de la microtomografía en 3D para cada sujeto de estudio a los lapsos previstos en el proyecto, se realizaron las mediciones correspondientes al área del defecto y del tejido formado en cada caso. Estos resultados se compararon con el área total del defecto obteniendo así un porcentaje de regeneración ósea para cada grupo.

En cada grupo se obtuvo el promedio de las tres ratas por cada grupo en los lapsos de tiempo establecidos y se compararon entre sí mediante una gráfica. (Gráfica 1) obteniendo el valor del error estándar tal como se muestra a continuación.



Los datos obtenidos al día 7 comparados con el grupo control no revelan cambios significativos en los diferentes grupos; al día 30 la regeneración ósea en el grupo 1 experimental es discretamente mayor al grupo control, y en los grupos 2 y 3 experimentales, los cuales fueron adicionados con células osteoblásticas, la

regeneración del defecto óseo es mayor al 20% del total sin evidencia de diferencias significativas entre estos grupos. Gráfica 1.

Al día 90 el grupo experimental con PLA al 10% sin células sigue manteniendo la misma ventaja en comparación con el grupo control, presentando un crecimiento exponencial de tejido óseo. El grupo de PLA al 7% con células osteoblásticas demuestra ser más efectivo que el grupo de PLA al 10% con células osteoblásticas, reflejando una ventaja de 8%, logrando una regeneración ósea del 59%. Gráfica 1.

En el último análisis, al día 120, el porcentaje de regeneración ósea del defecto crítico en calvaria de rata obtenido por cada grupo fue: grupo control 21.8%, grupo 1 PLA al 10% sin células osteoblásticas 37.23%, grupo 3 PLA al 10% con células osteoblásticas 65.72% y grupo 2 PLA al 7% con células osteoblásticas 78.07%. Gráfica 1.

El análisis mediante la microtomografía computarizada muestra que en el grupo control la regeneración del defecto fue de 21.2% del total sin formación de hueso *novo* al centro del defecto, formación de tejido cicatrizal exclusivamente en la periferia de este con una densidad distinta a la cortical del hueso sano de la rata a la cuarto mes. Figura 20.

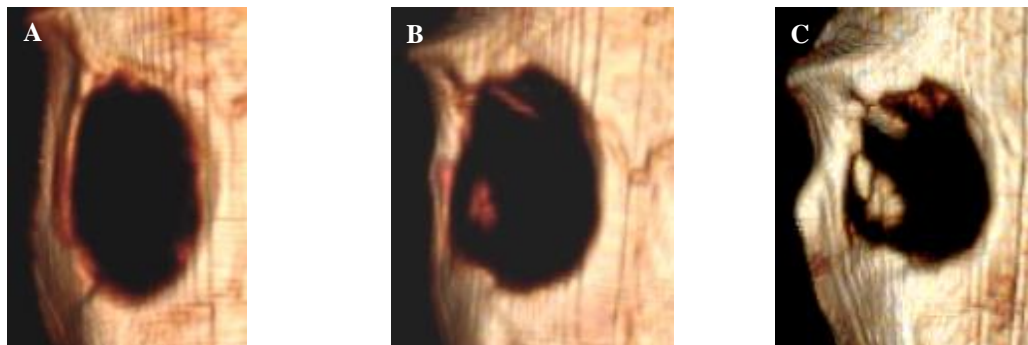


Figura 20. Microfotografía computarizada. Grupo control. A. Evolución del defecto a los 7 días. B. Evolución a 30 días. C. Evolución a 120 días.

Fuente: Directa

En el grupo 1 experimental el cual fue una matriz de PLA al 10%, la regeneración ósea lograda al día 120 fue de 35.7% del total, la reducción del defecto fue periférica y se observa una formación intrínseca al defecto con una densidad muy parecida a la del hueso parietal indicando la *neo* formación ósea. Figura 21.

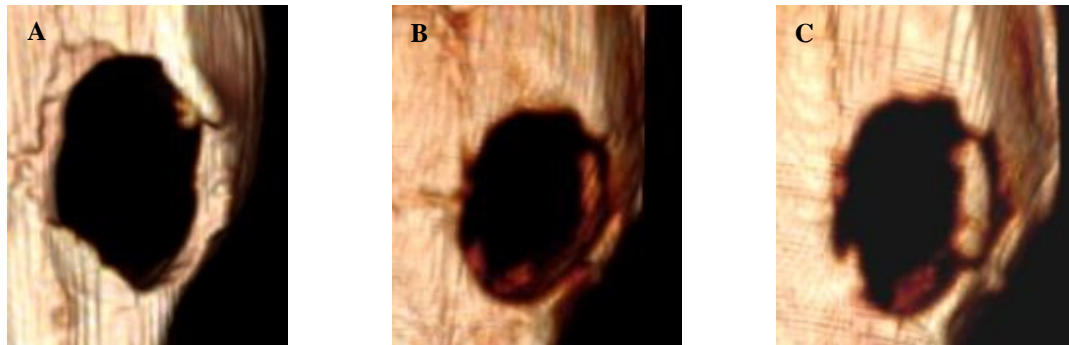


Figura 21. Microfotografía computarizada. Grupo 1: PLA al 10%. A. Evolución del defecto a los 7 días. B. Evolución a 30 días. C. Evolución a 120 días.
Fuente: Directa

En el segundo grupo experimental, se utilizó matrices de PLA al 7% provistas de células osteoblásticas, la regeneración ósea obtenida al día 120 fue del 78.07%; siendo este el grupo con mejores resultados registrados en esta investigación, se observa el crecimiento de varias islas al interior del defecto que con el paso del tiempo se van asociando y una reducción en la periferia del defecto al mismo tiempo. La densidad ósea es semejante a la del hueso parietal en contraparte a la zona del defecto, indicando así la regeneración ósea exitosa. Figura 22.

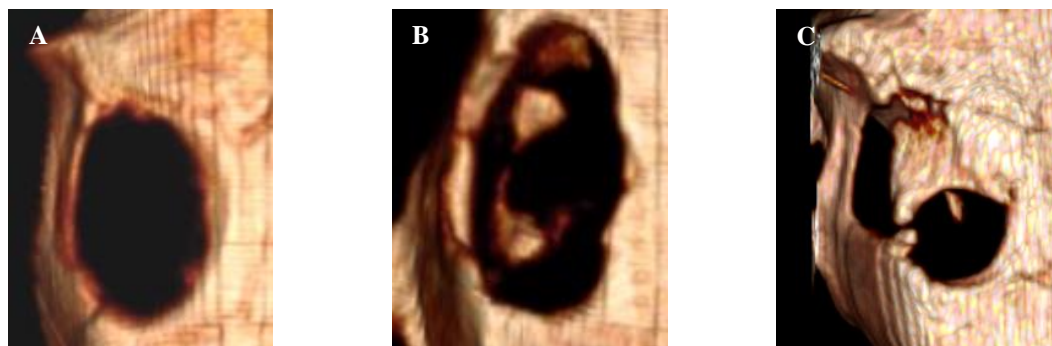


Figura 22. Microfotografía computarizada. Grupo 2: PLA al 7% con células osteoblásticas. A. Evolución del defecto a los 7 días. B. Evolución a 30 días. C. Evolución a 120 días.
Fuente: Directa

Por último en el grupo experimental 3, dentro del cual se empleó la matriz al 10% de PLA adicionada células osteoblásticas, el porcentaje de regeneración obtenido al cuarto mes de evolución, fue de 65.7%, observándose el progreso de la regeneración ósea periférica y en la zona central del defecto con formación de tejido nuevo que se asocia para cubrir gran parte de este, la densidad ósea es menor que la densidad del hueso de la rata, indicando que el hueso formado es de menor calidad que el logrado con PLA al 7% y células osteoblásticas. Figura 23.

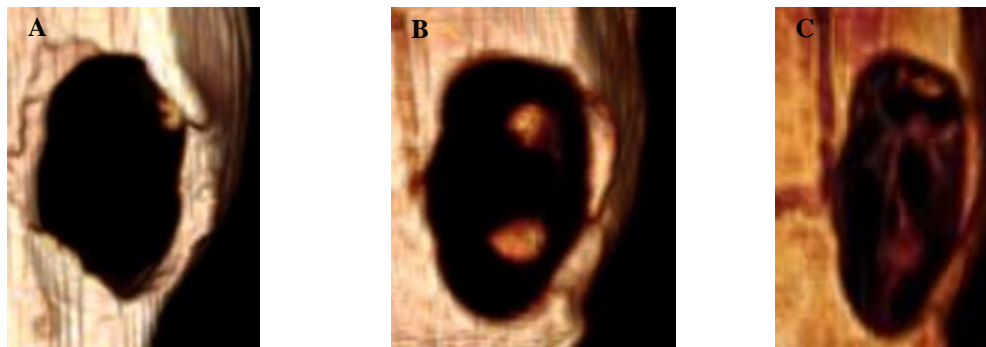


Figura 23. Microfotografía computarizada. Grupo 3: PLA al 10% con células osteoblásticas.
A. Evolución del defecto a los 7 días. B. Evolución a 30 días. C. Evolución a 120 días.
Fuente: Directa



DISCUSIÓN

Es una realidad que con la aparición de nuevos y mejores aparatos y tecnologías para el apoyo de la ciencia y sus avances, se ha ido mejorando la calidad de vida humana, en este sentido la odontología ha sido provista de muchas herramientas innovadoras para el desarrollo de investigaciones y estudios experimentales, se ha visto beneficiada de novedosas técnicas y materiales para su aplicación en el tratamiento de las enfermedades y anomalías que aquejan a los pacientes desde la antigüedad. En este caso esta investigación fue dirigida para la solución y mejora de los materiales de regeneración ósea que se utilizan en la actualidad, los cuales no poseen la capacidad suficiente para concebir una regeneración ósea adecuada en los tiempos y área esperado, es por ello que en este estudio se trabajó con una matriz de PLA la cual fue puesta a grupos experimentales con diferentes concentraciones y también se consideró la variable células osteoblásticas para demostrar sí que estas células tenían injerencia en el potencial de regeneración ósea.

Dado que el grupo control no logró regenerarse en su totalidad, los resultados de esta investigación concuerdan con Gómez y colaboradores que a partir de 5mm el defecto de calvaria es óptimo para evaluar la capacidad osteogénica de los materiales. En el estudio realizado por este autor se utilizó PLA de alto peso molecular y una concentración de 15% por lo cual no se obtuvo una respuesta osteoconductora ni angiogénica debido al tamaño y número de poros, mientras que en esta investigación el PLA en una concentración del 7% permitió tener un mayor número de poros y de mejor tamaño lo que potencializó la proliferación de células osteoblásticas.⁵⁵

Para una matriz de PLA, Blokwins *et. al.* (2011) explican que el PLA de Mayor concentración tienen una reabsorción de 18 a 24 meses, para esta investigación se utilizó PLA de menor concentración lo que permitió acelerar el proceso de reabsorción.⁵⁶



El sistema de microtomografía computarizada *in vivo* utilizado en el presente estudio, permitió la observación de estructuras óseas microscópicas en pequeños animales a diferentes tiempos de evolución sin necesidad de sacrificar a los animales en cada lapso, dando la posibilidad a tener un grupo con menos sujetos de estudio y menor variabilidad biológica, a comparación de métodos de microscopia en los cuales los grupos tienden a ser más numerosos para poder sacrificar sujetos de estudio en cada lapso de tiempo, concordando con lo planteado por Hasuike, Ozawa (2017).⁵⁷

Al comparar los resultados que se obtuvieron contra los de Ren en el año 2005, existen coincidencia con los reportados por el autor, quien afirmó que la biomatriz de PLA sin células no es capaz de regenerar la totalidad del defecto y se reafirma que el andamio poroso es solo un transportador para la implantación celular y no tiene función de inducción ósea.⁵⁸

Se compararon injertos de PLA sembrados con células osteoblásticas diferenciadas a partir de HMSC (células mesenquimales humanas), los resultados del porcentaje de regeneración del defecto son similares a los obtenidos en este estudio, observando similitud en la efectividad de esta combinación para regenerar el defecto, también se menciona que se encontró un mayor porcentaje de regeneración con el uso de PLA adicionadas con células osteoblásticas derivadas de HSCM a comparación de células osteoblásticas ya diferenciadas en un 15%.⁵⁹

No obstante esto se contradice al estudio previo sobre el modelo de trasplante de ratones atímicos realizado por Meniel, dentro del cual se demostró que a la implantación en ratones tanto de HMSC como de osteoblastos diferenciados de HMSC, para la regeneración de un defecto, no presenta diferencias significativas.⁶⁰

Se podría pensar que esto no solo se debe al efecto de los osteoblastos sobre la regeneración osteogénica para reconstruir totalmente el defecto, sino en el efecto de



sus funciones indirectas de las células HSMC en el trasplante genogénico como las que menciona Kim en el 2007. ⁶¹

En las imágenes del microtomógrafo se observa que en los grupos con células osteoblásticas sembradas en el andamio la regeneración del efecto se presenta en la periferia y se forma hueso al centro del defecto simultáneamente a comparación del grupo control donde la reducción de este solo es de forma periférica, estos resultados se ven sustentados por los estudios realizados por Panitch *et. al.* ⁶²



CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos dentro de esta investigación se determina que el PLA por si solo y como elemento aislado, no es capaz de regenerar defectos óseos críticos, es decir mayores a 5mm y que solo posee funcionalidad como un transporte y andamio de células con capacidades inductivas. Lo cual apoya a la hipótesis H_{a2} “los andamios de PLA adicionadas con células osteoblásticas generaran en mayor porcentaje regeneración ósea *in vivo* que las los andamios de PLA desprovistos de osteoblastos”.

Los resultados que esta investigación arrojó indican que el PLA en una concentración del 7% es más eficaz para la regeneración ósea que el PLA en una concentración del 10%. Aceptando la hipótesis H_{03} “el andamio de PLA al 7% es más efectiva en el potencial de regeneración ósea versus la membrana de PLA al 10%.” Puesto que al tener menor concentración tiene una superficie con mayor número de poros lo que permite aumentar el fenómeno de migración celular con potencial inductor lo que resulta en una reproducción celular más acelerada.

Se dictamina que a menor concentración del PLA se obtendrá mejores resultados que aunado al sembrado de células osteoblásticas tienen la capacidad de regenerar el defecto óseo. Obteniéndose así un material viable para el desarrollo de nuevos productos que en el área odontológica permitan restaurar la salud bucal de pacientes con patologías que atañen a la perdida de hueso en maxilares resultado de diversos procesos mórbidos y en general cualquier defecto óseo del cuerpo humano.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramseier CA, Rasperini G, Batia S, Giannobile WV. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontol* 2000. junio de 2012;59(1):185-202.
2. Tverdokhlebov S, Bolvasov E. Modification of polylactic acid surface using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target for increased biocompatibility - ScienceDirect [Internet]. [citado 16 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433214028530>
3. Siqueira L, Passador FR, Costa MM, Lobo AO, Sousa E. Influence of the addition of β -TCP on the morphology, thermal properties and cell viability of poly (lactic acid) fibers obtained by electrospinning. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;52:135-43.
4. Liang T, Mahalingam S, Edirisinghe M. Creating “hotels” for cells by electrospinning honeycomb-like polymeric structures. *Mater Sci Eng C*. 1 de octubre de 2013;33(7):4384-91.
5. Shue L, Yufeng Z, Mony U. Biomaterials for periodontal regeneration. *Biomatter*. 1 de octubre de 2012;2(4):271-7.
6. Astii A, Gioglio L. Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 16 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24744164>
7. Kim JH, Park CH, Perez RA, Lee HY, Jang JH, Lee HH, et al. Advanced Biomatrix Designs for Regenerative Therapy of Periodontal Tissues. *J Dent Res*. diciembre de 2014;93(12):1203-11.
8. Polimeni G, Koo K-T, Pringle GA, Agelan A, Safadi FF, Wikesjö UME. Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res*. mayo de 2008;10(2):99-105.
9. Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J*. octubre de 2011;6(10):1187-97.
10. Eldesoqi K, Henrich D, El-Kady AM, Arbid MS, Abd El-Hady BM, Marzi I, et al. Safety evaluation of a bioglass-polylactic acid composite scaffold seeded



with progenitor cells in a rat skull critical-size bone defect. *PloS One*. 2014;9(2):e87642.

11. Schofer MD, Roessler PP, Schaefer J, Theisen C, Schlimme S, Heverhagen JT, et al. Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. *PloS One*. 2011;6(9):e25462.
12. Stephan SJ, Tholpady SS, Gross B, Petrie-Aronin CE, Botchway EA, Nair LS, et al. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *The Laryngoscope*. mayo de 2010;120(5):895-901.
13. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. diciembre de 2000;21(23):2347-59.
14. Frayssinet P, Gineste L, Conte P, Fages J, Rouquet N. Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials*. junio de 1998;19(11-12):971-7.
15. Vallet-Regí M, Rámila A, Padilla S, Muñoz B. Bioactive glasses as accelerators of apatite bioactivity. *J Biomed Mater Res A*. 1 de septiembre de 2003;66(3):580-5.
16. Brunski J, Puleo D. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 16 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10697938>
17. Rámila A. A New Hydroxyapatite/Glass Biphasic Material: In Vitro Bioactivity - Chemistry of Materials (ACS Publications) [Internet]. [citado 24 de abril de 2018]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm011165p>
18. Black J, Grath H. Handbook of Biomaterial Properties: J. Black and G. Hastings,... [Internet]. [citado 24 de abril de 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/257019557_Handbook_of_Biomaterial_Properties_J_Black_and_G_Hastings_editors_Chapman_and_Hall_London_1998_xxiv590_pages
19. Vallet M. Ceramics for medical applications - Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions (RSC Publishing) [Internet]. [citado 24 de abril de 2018]. Disponible en: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2001/dt/b007852m#!divAbstract>



20. Zhang F, Chang J, Lu J, Lin K, Ning C. Bioinspired structure of bioceramics for bone regeneration in load-bearing sites. *Acta Biomater.* noviembre de 2007;3(6):896-904.
21. Rouahi M, Champion E, Hardouin P, Anselme K. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials.* mayo de 2006;27(14):2829-44.
22. Liu Y, Cooper PR, Barralet JE, Shelton RM. Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* marzo de 2007;28(7):1393-403.
23. Landis WJ. An overview of vertebrate mineralization with emphasis on collagen-mineral interaction. *Gravitational Space Biol Bull Publ Am Soc Gravitational Space Biol.* mayo de 1999;12(2):15-26.
24. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold Design for Bone Regeneration. *J Nanosci Nanotechnol.* enero de 2014;14(1):15-56.
25. Friedenstein, A. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976;47:327-55.
26. Canfield A, Doherty M. Osteogenic potential of vascular pericytes. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.; 2000. p. 143-51.
27. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993;91:1888-96.
28. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Luethy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19
29. Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press;1996. p. 51-67
30. Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissue. *J Bone Joint Surg Am* 1952;34:701.
31. Vanden L. Rigenerazione ossea guidata con membrane riassorbibili. *Dent admos.* 2000; (4): 37-55.
32. Canalis E, Economides A, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003; 24(2): 218-35.



33. Branemark R, Branemark PI, Rydevik B, Myers R. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation. A review. *J. Rehab. Reseach Dev.* 2001; 38 (2): 175-181.
34. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. Oral Surg.* 1981; 10: 387- 416.
35. Joos U, Meyer U. New paradigm in implant osseointegration. *Head and Face Medicine* 2006; 2 (19): 1-2.
36. Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials* 2001; 22: 1253-1262.
37. Watari F, Yokoyama A, Omori M, Hirai T, Kondo H, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for biomedical application. *Composites Science and Technology* 2004; 64: 893-908.
38. Lindhe J, Karring T, Araujo M. Anatomy of the periodontium. En: Lindhe J, Karring T, Lang N, eds. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Blackwell Munksgaard, 2003: 3-49.
39. Davies J. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007; 28: 5058-5067.
40. Ellingsen J, Thomsen P, Lyngstadaas P. Advances in dental implant materials and tissue regeneration. *Periodontology* 2000 2006; 41: 136-156.
41. Leckholm U. The surgical site. En: Lindhe J, Karring T, Lang N, eds. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Blackwell Munksgaard, 2003: 852-865.
42. Huang Y, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjö U. Bone formation at titanium porous oxide [TiUnite] oral implants in type IV bone. *Clin. Oral Impl. Res.* 2005; 16: 105-111.
43. Lang N, Araujo M, Karring T. Alveolar bone formation. En: Lindhe J, Karring T, Lang N, eds. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* Blackwell Munksgaard, 2003: 866-896.
44. Heydenrijk K, Raghoobar GM, Meijer HJA, van der Reijden WA, van Winkelhoff AJ, Stegenga B. Two-stage IMZ implants and ITI implants inserted in a single-stage procedure. A prospective comparative study. *Clin. Oral Impl. Res.* 2002; 13: 371- 380.
45. Watari F, Yokoyama A, Omori M, Hirai T, Kondo H, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for biomedical application. *Composites Science and Technology* 2004; 64: 893-908.



46. Niinomi N. Fatigue characteristics of metallic biomaterials. *International Journal of Fatigue* 2007; 29: 992-1000.
47. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* enero de 2011;45(1):14-24.
48. Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile WV. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *J Dent Res.* diciembre de 2009;88(12):1065-76.
49. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* agosto de 2014;25(8):879-93.
50. Paulus MJ, Gleason SS, Kennel SJ, Hunsicker PR, Johnson DK. High Resolution X-ray Computed Tomography: An Emerging Tool for Small Animal Cancer Research. *Neoplasia N Y N.* enero de 2000;2(1-2):62-70.
51. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Nom-062-Zoo.* 1999;1-58.
52. Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorio de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria. 1995.
53. Norma Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995, Sistema Nacional de Vigilancia Epizootológica. 2002;1-10.
54. Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales. 1995.
55. De D, Bustamante A, Osorio Suarez G, Sebastian J, Mesa S, Gomez A, et al. Descripción de los cambios histológicos producidos a 60 días por una matriz de ácido poliláctico de alto peso molecular aglutinada con fosfato tricálcico injertada en calvaria de rata. *Rev ODONTOS.* 1 de octubre de 2012;39.
56. Blokhuis TJ, Arts JJC. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury.* septiembre de 2011;42 Suppl 2:S26-29.
57. Kaubota T, Hasuike A, Osawa Y. Regenerative capacity of augmented bone in rat calvarial guided bone augmentation model [Internet]. [citado 26 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5410555/>
58. Ren T, Ren J, Jia X. The bone formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 26 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16025492>
59. Zong C, Xue D, Yuan W. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid



scaffolds. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 26 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21249628>

60. Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone*. noviembre de 2005;37(5):688-98.
61. Kim J, Kim IS, Cho TH, Lee KB, Hwang SJ, Tae G, et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. abril de 2007;28(10):1830-7.
62. Panitch A, Seal B, Otero T. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mat Sci & Eng*. 2001; 34 (4-5): 147-230.