



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE TEJIDO NEOFORMADO POR
EFECTO COMBINADO DEL PÉPTIDO CAP-p15 CON UN
ANDAMIO DE QUITOSANO EN DEFECTOS CRÍTICOS
DE CALVARIA DE RATAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

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

P R E S E N T A:

CÉSAR TÉLLEZ ZÁRRAGA

TUTOR: Dr. GONZALO MONTOYA AYALA

ASESOR: Dra. LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre, María del Rosario Zárraga Hernández

Por apoyarme durante toda mi formación académica, por brindarme tu cariño, esfuerzo y estar conmigo siempre motivándome a seguir adelante.

A mi padre, José Rodolfo Téllez Soto

Por todo tu apoyo, confiar en mí y el cariño que me has dado siempre.

A mi familia

Por ayudarme a salir adelante, su hospitalidad, confianza y amor que me han dado.

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

A mi tutor, el Dr. Gonzalo Montoya Ayala, por sus enseñanzas, apoyo, tiempo y dedicación que me brindó.

A mi asesora, la Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez, por su tiempo, aprendizajes, observaciones y apoyo durante todo este proceso de titulación.

A mis revisores, el Dr. Higinio Arzate, el Dr. Enrique Romo Arévalo y la Dra. Claudia Patricia Pedraza Zamora, por cada aportación y sugerencia para este trabajo.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados.

A la Mtra. Blanca Estela Hernández Ramírez, por sus conocimientos y ser un ejemplo para mí durante la licenciatura.

A mi compañera de laboratorio, Lourdes Mayarí Torres Camas, por tu amistad y colaboración en este proyecto.

A la Mtra. Guadalupe del Carmen Ureiro Cueto y al Mtro. Alberto Mimila Cortés, por cada enseñanza y asesoría.

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias a los recursos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, Clave: **IN213822, IN204120.**

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA: Aminoácidos

ALP: Fosfatasa alcalina

Asp: Ácido aspártico

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas

BSP: Sialoproteína ósea

CAP: Proteína de adhesión del cemento

CSF-1: Factor estimulante de colonias 1

DMP1: Proteína de la matriz dentinaria 1

E11: Podoplanina

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GAG: Glucosaminoglucanos

Glu: Ácido glutámico

HA: Hidroxiapatita

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IG: Inmunoglobulinas

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IT: Ingeniería de tejidos

ITO: Ingeniería de tejido óseo

MEC: Matriz extracelular

MGP: Proteína Gla de la matriz

MMP: Metaloproteinasas de la matriz

MPS: Sistema fagocítico mononuclear

OCN: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerina

OPN: Osteopontina

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

PDGF: Factores de crecimiento derivados de plaquetas

Phe: Fenilalanina

RANK: Receptor activador para el factor nuclear kappa-B

RANKL: Ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa-B

SPARC/BM-40: Osteonectina

TC: Tricrómica de Masson

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TRAP: Fosfatasa ácida tartrato resistente

TRITC: Isotiocianato de tetrametil rodamina

TSP: Trombospondina

μm : Microgramo

μm : Micrómetro

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
Hueso	5
Ingeniería de tejidos	20
Caracterización de tejidos	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
METODOLOGÍA	30
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIÓN	44
REFERENCIAS	45

RESUMEN

El hueso es un tejido conectivo especializado, dinámico y vascularizado formado por una matriz mineralizada. Se encuentra en constante formación y resorción, lo que permite el mantenimiento de su volumen y la reparación del daño tisular. Un desbalance en el equilibrio entre la pérdida y formación del tejido óseo, asociado a diversos factores etiológicos (como traumatismos, procesos infecciosos, osteoporosis, osteopenia, quistes o tumores, entre otros), pueden conllevar a una significativa pérdida de densidad o masa ósea. En la ingeniería de tejido óseo, se han utilizado andamios de distintos biomateriales a base de polímeros, cerámicas o metales. Aunado a los andamios, se han empleado diversos fenotipos celulares y una gran variedad de moléculas o factores de crecimiento con la finalidad de replicar las señales moleculares que promueven la proliferación y diferenciación celular, que al ser probados en entornos *in vivo* y/o *ex vivo* han permitido el desarrollo de alternativas regenerativas prometedoras. Estudios previos en el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados han permitido establecer una estrategia metodológica donde, a partir del empleo de andamios sintetizados de quitosano y en combinación con péptidos derivados de las proteínas de la matriz del cemento radicular, se ha logrado observar la neoformación de un tejido mineralizado similar al hueso.

Objetivos: Determinar si el tejido neoformado por la combinación del péptido CAP-p15 con un andamio de quitosano, en defectos críticos de calvaria de ratas, es tejido óseo.

Metodología: Se utilizaron 6 ratas de la cepa Wistar a las cuales se les realizaron defectos de tamaño crítico en la calvaria (9 mm de diámetro). A un grupo (n=3) se les colocó un andamio de quitosano, y al otro grupo (n=3) se les colocó un andamio de quitosano embebido con CAP-p15 (20 µg). Al término de 4 meses, se llevó a cabo un análisis de histomorfometría del tejido neoformado para cada grupo, y se evaluó la presencia de marcadores osteogénicos específicos mediante ensayos de inmunofluorescencia.

Resultados: El análisis histológico demostró que el tejido neoformado en calvaria de ratas por la combinación del péptido CAP-p15 con andamios de quitosano muestra las características del tejido óseo. En la histomorfometría se observó un porcentaje elevado de regeneración. Las imágenes obtenidas mediante los ensayos de inmunofluorescencia demostraron la presencia de marcadores osteogénicos relacionados a la formación y mineralización del hueso.

Conclusión: De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio, el andamio de quitosano en combinación con CAP-p15 constituye una alternativa prometedora para su futura aplicación clínica en la regeneración de tejido óseo debido a que ha demostrado que tiene relevancia en cuanto al porcentaje obtenido de formación ósea en los defectos críticos de calvaria de ratas a los 120 días; además, se demostró que el andamio de quitosano logra su biodegradación en menos de 4 meses.

ABSTRACT

Bone is a dynamic, vascularized, and mineralized connective tissue that is in constant formation and resorption, which allows the maintenance of bone volume and the repair of tissue damage. An imbalance between the loss and formation of bone tissue, associated with trauma, infectious processes, osteoporosis, osteopenia, cysts, or tumors, can lead to a significant loss of bone density or mass. The bone repair/regeneration process involves a regulated expression of genes and proteins that result in various responses at molecular, biochemical, histological, and biomechanical levels. In bone tissue engineering, different biomaterials (such as polymers, ceramics, or metals) have been employed as scaffolds to mimic the extracellular matrix. In addition, various cell phenotypes and a wide variety of molecules or growth factors have been used to replicate the molecular signals that promote cell proliferation and differentiation, obtaining promising results in regenerative therapies. Previous studies in the Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados (UNAM) have established a methodological strategy with the use of natural scaffolds synthesized from chitosan and in combination with peptides derived from cementum-specific proteins to generate novel alternatives in the neoformation of bone.

Objectives: To determine if chitosan's scaffolds embedded with CAP-p15 peptide promote the bone's neoformation, in rat calvarial critical defects.

Methodology: 6 Wistar rats strains were subjected to calvarial critical-size defects (9 mm in diameter). One group (n=3) was treated with only chitosan scaffolds, and the other group (n=3) had chitosan scaffolds with CAP-p15 (20 µg). At the end of 4 months, histomorphometric analysis of the newly formed tissue was carried out for each group, and the presence of specific osteogenic markers was evaluated by immunofluorescence assays.

Results: Histological analysis demonstrated that a chitosan scaffold achieves biodegradation in less than 4 months. Also, the tissue neoformed in rat calvarias defects treated with the combination of the CAP-p15 peptide with chitosan scaffolds shows the characteristics of bone tissue. Histomorphometry showed a high percentage of regeneration. The images obtained by immunofluorescence assays showed the presence of osteogenic markers related to bone formation and mineralization.

Conclusion: According to the results obtained in this study, chitosan scaffolds in combination with CAP-p15 promote the formation of bone in critical calvarial defects of rats at 120 days and constitute a promising alternative for its future clinical application in the regeneration of bone tissue.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Hueso

El hueso es un tejido conectivo especializado formado por una matriz mineralizada que entre sus funciones están proporcionar soporte mecánico, brindar protección a órganos vitales, alojar a la médula ósea, participar de manera activa en la homeostasis hematopoyética, contribuir en la inserción de fibras musculares, tendones y ligamentos; almacenar y regular iones como el calcio o fosfato, además de cumplir una función endocrina importante.¹⁻³ Este tejido mineralizado, dinámico y vascularizado se encuentra en constante formación y resorción, lo que permite el mantenimiento de su volumen, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfo-cálcico.⁴

El tejido conectivo que recubre las superficies externas del hueso se conoce como periostio, mientras que el tejido que reviste las cavidades óseas internas, adyacente a la vasculatura medular, se conoce como endostio.⁵ El periostio posee una capa interna compuesta de células óseas y una capa externa rica en vasos sanguíneos, nervios, colágena y fibroblastos. El endostio está conformado solo por una capa de células óseas.⁶

En la formación, crecimiento y mantenimiento del tejido óseo participan, de manera coordinada, células como las osteoprogenitoras, los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.^{1,7,8} En la Figura 1 se muestran las células que forman parte del hueso.

Las células troncales mesenquimales se localizan en el tejido conectivo de la médula ósea. Estas células mesenquimales pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, adipocitos y mioblastos.⁹

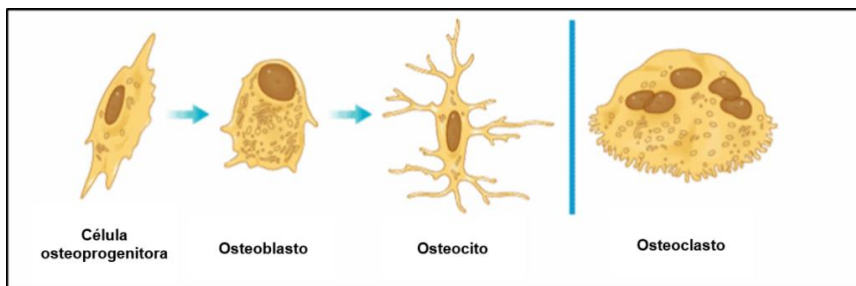


Figura 1. Esquema de las células óseas.¹

Las células osteoprogenitoras son células indiferenciadas de origen mesenquimal derivadas de la médula ósea, localizadas en el periostio y endostio, que tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos. Los osteoblastos son células localizadas en el endostio y los responsables de la síntesis de matriz orgánica denominada osteoide tanto en el hueso en crecimiento como en el maduro (a un ritmo de 2 a 3 μm por día). Son células poliédricas de aproximadamente 20-30 μm de tamaño y se desarrollan bajo influencia de la familia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β).⁹ Estas células pueden exhibir receptores y proteínas involucradas en la remodelación y mineralización ósea.² Producen proteínas extracelulares como la sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN), fosfatasa alcalina (ALP), osteonectina (SPARC/BM-40), osteopontina (OPN), trombospondina (TSP) y colágena tipo I.^{1,10} Los osteocitos son osteoblastos maduros que han quedado inmersos dentro de la matriz ósea que ellos mismos producen durante el proceso de deposición mineral, siendo las células más abundantes en el tejido óseo (10 veces más que los propios osteoblastos). Son responsables de la mecanosensibilidad, la mecanotransducción y se encargan de controlar el remodelado óseo.^{2,3,9} Los osteocitos presentan largos procesos similares a las dendritas con los que se comunican con otros osteocitos y osteoblastos por medio de canaliculos dentro de la matriz mineralizada, favoreciendo el intercambio de electrolitos y moléculas de pequeño tamaño.^{1,11} Por otro lado, los osteoclastos son células de hasta 150 μm de tamaño, multinucleadas (hasta 100 núcleos), derivadas del sistema fagocítico mononuclear (MPS) y cuya función es la resorción ósea mediante la regulación de enzimas de la matriz, tales como la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), colagenasa, catepsina K, glucuronidasa, entre otras.^{1,2,10,11} Estas células ocupan cavidades denominadas lagunas de Howship o lagunas de resorción.^{1,6,7} Poseen el receptor activador para el factor nuclear kappa-B (RANK), así como receptores para el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), la osteoprotegerina (OPG) y la calcitonina. El CSF-1 y el ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa-B (RANKL) son citocinas necesarias para la diferenciación, supervivencia y expansión de células precursoras de osteoclastos. La OPG es un receptor señuelo para RANKL y un regulador fisiológico negativo para la osteoclastogénesis.^{10,11} El paradigma actual dicta que la proporción de expresión de RANKL/OPG determina el grado de diferenciación y función de los osteoclastos.¹² En la Figura 2 se muestra la secuencia de la osteoclastogénesis y osteoblastogénesis.

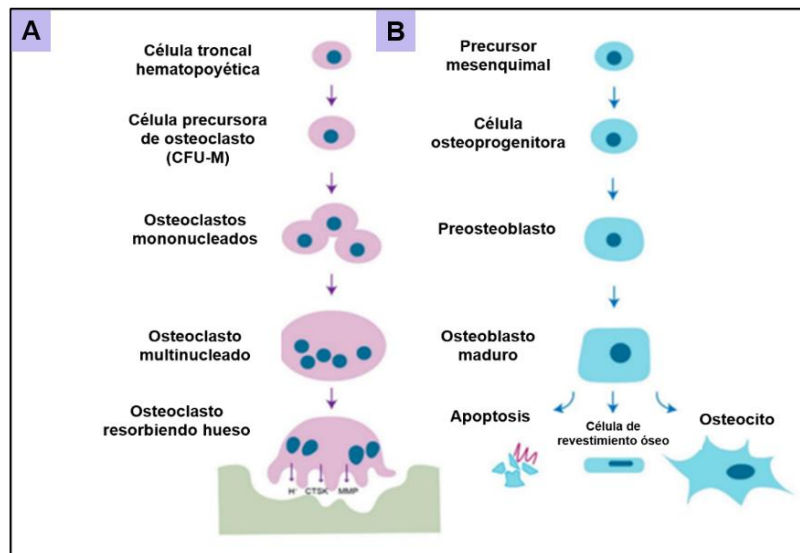


Figura 2. A) Osteoclastogénesis B) Osteoblastogénesis.¹⁰

En conjunto, estas células se encargan de mantener la homeostasis de la matriz ósea, la cual, se encuentra formada por componentes orgánicos (35-40%) e inorgánicos (60%-65%).¹ La matriz orgánica está compuesta por proteínas colágenas (90%), donde la colágena tipo I es la más abundante, y cuya función es actuar como un andamio biológico que permite la adhesión, proliferación y diferenciación celular; además, dirige el tamaño y la orientación de los cristales minerales. También incluye pequeñas cantidades de colágena tipo III y V, cuya función principal es proporcionar soporte mecánico y actuar como andamio para las células óseas.^{7,8} Además, se han encontrado vestigios de colágena tipo XI y XIII. El 10% restante del componente orgánico corresponde a proteínas no colágenas.¹³ Los cuatro grupos principales de proteínas no colágenas que hay en la matriz ósea son los siguientes:

- **Macromoléculas de proteoglicanos:** contienen una proteína central con cantidades diversas de cadenas laterales de glucosaminoglicanos (GAG), como el hialuronato, condroitín sulfato y queratán sulfato, unidos por medio de un enlace covalente. Contribuyen a que el tejido óseo ofrezca resistencia a la compresión, fijación de factores de crecimiento e inhibición de la mineralización.^{13,14}
- **Glucoproteínas multiadhesivas:** actúan en la adhesión de células óseas a la matriz extracelular (MEC). En este grupo se incluye la BSP, SPARC/BM-40, OPN, la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) y podoplanina (E11).^{13,14}

- Proteínas dependientes de vitamina K osteoespecíficas: capturan el calcio desde la circulación y estimulan a los osteoclastos en el remodelado óseo. En este grupo se encuentra la OCN, la proteína Gla de la matriz (MGP) y la proteína S.^{13,14}
- Factores de crecimiento y citocinas: pequeñas proteínas reguladoras que incluyen al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), TGF- β , los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), las BMPs, la esclerostina y las interleucinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6).^{13,14}

Dentro de todos estos grupos de proteínas destacan las BMPs, la BSP, OCN, ALP, SPARC/BM-40 y OPN, que en su conjunto desempeñan un papel importante en la adhesión celular, en la regulación de formación de colágena y en la biomineralización de la matriz ósea, e incluso algunas se han empleado como marcadores bioquímicos de la fisiología ósea.^{6,9,15,16} La descripción general de las proteínas no colágenas de mayor relevancia presentes en el tejido óseo se resume en la Tabla 1.

Proteína	Funciones
Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)	Inducen la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos. Estimulan la formación de tejido óseo.
Sialoproteína ósea (BSP)	Inicia el proceso de biomineralización. Actúa como nucleador de los cristales minerales. Participa en la unión celular.
Osteocalcina (OCN)	Participa en la regulación local del tejido óseo, favoreciendo la atracción de los precursores de osteoclastos. Tiene un papel inhibitorio de la formación ósea, al inhibir el crecimiento de cristales. Captura el calcio de la circulación y estimula a los osteoclastos.

Fosfatasa alcalina (ALP)	Hidroliza inhibidores de la deposición mineral y aumenta la concentración local de fosfatos. Participa en la biomineralización de la matriz. Regula la proliferación, migración y diferenciación osteoblástica.
Osteonectina (SPARC/BM-40)	Regula la organización de la colágena, la deposición de hidroxiapatita (HA) y factores de crecimiento. Participa en la unión al calcio. Adhesión de la colágena a los cristales de HA. Regula el tamaño, tipo y el crecimiento de los cristales formados. Tiene una actividad inhibitoria en la deposición de HA.
Osteopontina (OPN)	Regula e inhibe la biomineralización y remodelación ósea. Se une a las células y controla su proliferación. Regula el tamaño, tipo y el crecimiento de los cristales formados. Inhibe la formación de HA. Adhesión de las células a la matriz ósea.

Tabla 1. Descripción general de proteínas no colágenas presentes en el tejido óseo.^{6,12-17}

Las BMPs son un conjunto de proteínas endógenas implicadas en la diferenciación de células mesenquimales; tienen la capacidad de inducir la formación de tejido conectivo, cartílago, hueso, tejido muscular, tejido cardiaco, riñones, ojos, piel y dientes. Pertenecen a la familia de TGF- β y cumplen una función específica de acuerdo a su localización en los tejidos. En el tejido óseo, las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, condrocitos, plaquetas y células endoteliales producen BMPs.⁹ Por otro lado, RUNX2 es un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de los osteoblastos.¹⁸ Diversos estudios han demostrado que RUNX2 puede regular la expresión de las BMPs.¹⁸⁻²⁰ En la Tabla 2 se describen las características más relevantes de las BMPs.

BMP	Descripción general/Funciones
BMP-1	No pertenece a la familia de TGF- β .
*BMP-2	Participa en la diferenciación osteoblástica. Induce la apoptosis.
*BMP-3	BMP más abundante en hueso. Inhibe la osteogénesis.
*BMP-4	Osteogénica. Osteoinductiva. Participa en el desarrollo del pulmón y ojo.
*BMP-5	Participa en la condrogénesis. Osteogénica.
*BMP-6	Participa en la condrogénesis. Diferenciación osteoblástica. Osteogénica.
*BMP-7	Osteoinductiva. Participa en el desarrollo del riñón y ojo. Ha reportado tener actividad inhibitoria en la formación de hueso.
*BMP-8	Osteoinductiva.
*BMP-9	Se secreta en sistema nervioso y MPS hepático. Osteogénica.
BMP-10	Participa en el desarrollo cardiaco.
BMP-11	Se encuentra en tejidos neuronales.
BMP-12	Participa en la formación de tendones.
BMP-13	Participa en la formación de tendones y ligamentos.
*BMP-14	Mejora la cicatrización de tendones y participa en la formación de hueso.
BMP-15	Estimula la actividad hormonal.

Tabla 2. Descripción general de las BMPs.^{6,9,12-14} *BMPs que se encuentran más relacionadas al tejido óseo.

El componente inorgánico del hueso está formado por sales de calcio y fosfato estructurados en forma de cristales de hidroxiapatita (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ y pequeñas cantidades de carbonato, magnesio, manganeso, flúor, potasio y sulfato. Las proteínas con capacidad adhesiva como OPN, BSP y DMP1 favorecen la biomineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben.^{15,17}

Existen dos tipos de hueso: esponjoso (trabecular) y compacto (denso), los cuales se distinguen por su porosidad, ubicación y función (Figura 3). El hueso esponjoso está formado por redes irregulares de láminas delgadas con un alto grado de porosidad, denominadas trabéculas. Los espacios que quedan entre las trabéculas están llenos de médula ósea, ya sea formada por tejido hematopoyético o por tejido adiposo. En estas trabéculas existen lagunas donde se localizan los osteocitos; los vasos sanguíneos del periostio penetran al hueso esponjoso y los osteocitos reciben su nutrición directamente de la sangre que circula por las cavidades medulares.^{1,2,13}

El hueso compacto o maduro, como es comúnmente conocido, está compuesto por un sistema de laminillas circunferenciales externas e internas, osteonas/sistemas de Havers y laminillas intersticiales. Se localiza en las porciones externas de todos los huesos y posee una estructura dura que proporciona rigidez. Las osteonas o sistemas de Havers consisten en láminas concéntricas de matriz ósea, contienen un canal central denominado conducto de Havers recubierto por endostio, el cual contiene tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos y fibras nerviosas; están comunicados con el periostio y la cavidad medular.^{1,13} Los conductos de Volkmann son túneles dentro del hueso laminar, que tienen como función comunicar los conductos de Havers entre sí. Las laminillas circunferenciales siguen la totalidad de la circunferencia externa e interna de la diáfisis del hueso largo. Las laminillas circunferenciales externas se encuentran por debajo del periostio y presentan fibras de Sharpey, que fijan el hueso al periostio en los sitios de inserción tendinosa; las laminillas circunferenciales internas están situadas alrededor de la cavidad medular y a partir de estas se extienden las trabéculas del hueso esponjoso.^{2,3,13}

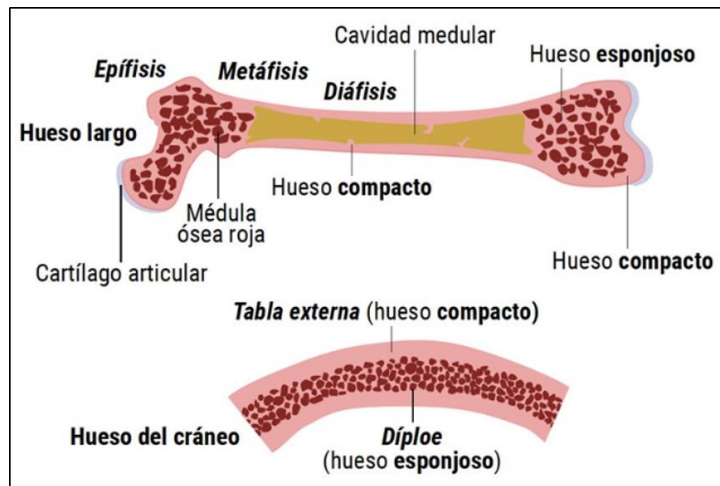
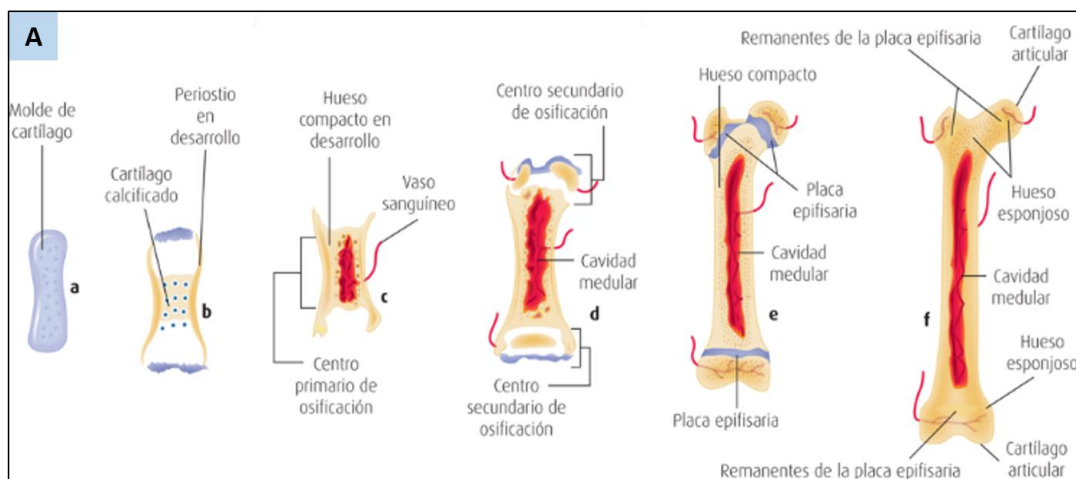


Figura 3. Esquema de las partes que conforman los huesos largos y planos.²¹

Para entender el proceso de regeneración ósea es necesario reconocer que el tejido óseo se forma a partir de tejido mesenquimatoso o cartilaginoso. Este proceso se denomina osificación intramembranosa y endocondral, respectivamente. La osificación intramembranosa se realiza mediante la biomineralización directa de la matriz secretada por los osteoblastos y da origen a los huesos planos como los del cráneo (calvaria), cara, maxila y clavícula. La osificación endocondral se lleva a cabo a través de la sustitución de un molde cartilaginoso preexistente y da origen a los huesos largos de las extremidades y partes del esqueleto axial que soportan el peso del cuerpo, así como a los huesos cortos.^{1,12,13} Las diferencias entre estos huesos de distinto origen se encuentran en la carga funcional y la vascularización. Por ejemplo, el hueso de origen intramembranoso tiene una vascularización mayor que el origen endocondral, lo que puede ser un factor determinante en cuanto a la concentración de proteínas a nivel local.^{9,12} En la Figura 4 A y B se esquematiza la osificación endocondral e intramembranosa.



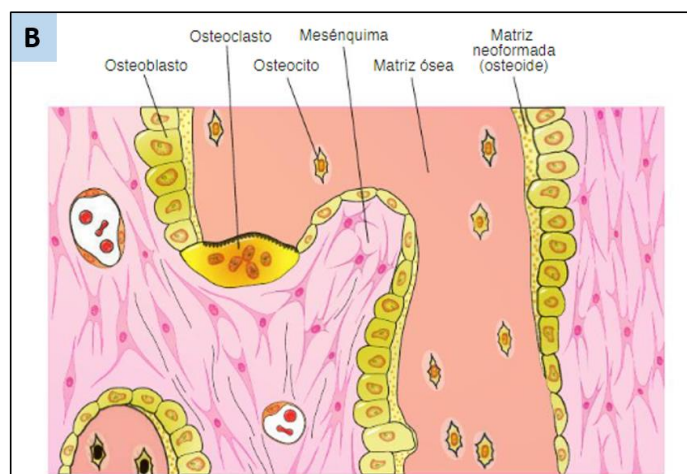


Figura 4. A) Representación de la osificación endocondral.¹ B) Esquema de la osificación intramembranosa.²²

Asimismo, es importante comprender que la interacción molecular entre los componentes orgánicos e inorgánicos que dan lugar a la formación y maduración del hueso se lleva a cabo a través de un complejo proceso denominado biomineralización, que es el proceso mediante el cual se producen minerales en sistemas biológicos mediante un control altamente regulado por proteínas, péptidos y moléculas.^{15,17}

La matriz extracelular (MEC) es el andamio que las fibras de colágena proporcionan, y dónde la HA se nuclea y crece. La nucleación de la HA se inicia principalmente por un conjunto de proteínas no colágenas fosforiladas y con carga negativa que están asociadas a la MEC. Estas proteínas atraen los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} a través de sus dominios de aminoácidos (AA) cargados y aumentan la sobresaturación local a un nivel suficiente para formar núcleos de un tamaño crítico, que puedan convertirse en cristales de HA.¹⁷

La maduración de la matriz se asocia con la expresión de ALP y varias proteínas no colágenas, incluidas OCN, OPN y BSP. Se cree que estas proteínas de unión a calcio y fosfato ayudan a regular la deposición ordenada de minerales mediante la regulación de la cantidad y el tamaño de los cristales de HA formados.^{13,17}

El mineral óseo se deposita inicialmente entre los extremos de las fibrillas de colágena. Este proceso puede ser facilitado por vesículas de matriz extracelular en el hueso. Las vesículas extracelulares de la matriz se sintetizan a través de condrocitos y osteoblastos, y sirven como microentornos protegidos en los que las concentraciones de calcio y fosfato pueden aumentar lo suficiente para precipitar la formación de cristales.¹⁷

Las vesículas extracelulares de la matriz contienen un núcleo que está compuesto por proteínas y un complejo de fosfolípidos ácidos, calcio y fosfato inorgánico que es suficiente para precipitar los cristales de HA. A medida que el hueso madura, los cristales de HA aumentan y reducen su nivel de impurezas.¹⁷

La ampliación de los cristales se produce tanto por el crecimiento de los cristales como por la agregación. Las macromoléculas de la matriz ósea pueden facilitar la nucleación cristalina inicial, secuestrar iones minerales para aumentar las concentraciones locales de calcio y/o fosfato, o facilitar la nucleación heterogénea. Las macromoléculas también se unen a las superficies del cristal en crecimiento para determinar el tamaño, la forma y el número de cristales formados.¹⁷ Además de la concentración de iones de fosfato-calcio y las proteínas no colágenas, el crecimiento de los cristales está determinado por el pH y la temperatura en el entorno intra y extracelular.²³ En la Figura 5 se muestra el proceso de biomineralización mediante vesículas extracelulares.

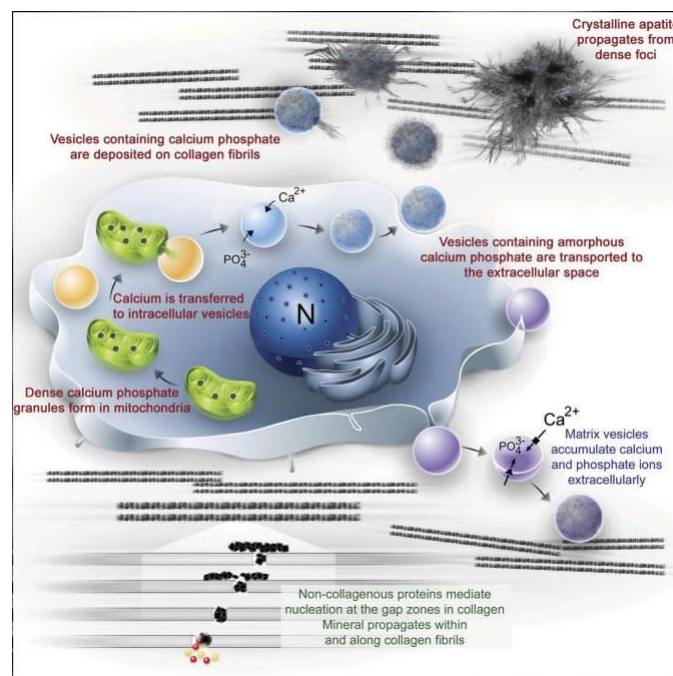


Figura 5. Modelo del mecanismo de biomineralización en el tejido óseo.²⁴

Los promotores de mineralización confirmados (nucleadores) incluyen a la DMP1 y la BSP. Además, otras proteínas como la ALP ósea pueden aumentar las concentraciones locales de fósforo, eliminar los inhibidores que contienen fosfato del crecimiento de cristales de HA o modificar las fosfoproteínas para controlar su capacidad de actuar como agentes nucleadores.¹⁷

Estudios *in vitro* han demostrado que, de manera similar a las proteínas, los AA con carga son capaces de inhibir o inducir a la mineralización de la HA; tal es el caso del ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu) y fosfoserina que son muy abundantes en el dominio ácido de las proteínas no colágenas (OPN, BSP, DMP1) involucradas en la mineralización de la HA en hueso y dentina.¹⁷

Otro proceso fundamental en la fisiología del hueso es el remodelado óseo, donde el crecimiento de los huesos consiste en la formación de tejido óseo nuevo acompañado de la resorción parcial del tejido ya formado; de esta manera, los huesos mantienen su forma al tiempo que crecen. Es un proceso altamente coordinado por los osteoclastos y osteoblastos, pues es vital para la reparación del hueso dañado y mantener la homeostasis mineral.^{1,6,11,13} En la Figura 6 se esquematiza el proceso de remodelado óseo.

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases:

Fase quiescente: El hueso se encuentra en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no están presentes.^{11,13}

Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea, el cual implica la detección de una señal de iniciación de la remodelación: esta señal puede ser una tensión mecánica sobre el hueso o acción hormonal. Los osteocitos detectan estas señales y se induce una ola de respuestas transcripcionales que producen/modulan la secreción de moléculas que reclutan precursores de osteoclastos e inducen su activación y diferenciación.^{11,13}

Fase de resorción: Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son secretadas por los osteoblastos en respuesta a señales mecánicas y endocrinas. Las MMP degradan el osteoide no mineralizado que recubre la superficie del hueso y exponen los sitios de adhesión RGD, necesarios para la unión de los osteoclastos. Los iones de hidrógeno son bombeados y la disolución de la matriz mineralizada ocurre en este espacio ácido, produciendo las lagunas de Howship. Los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide por medio de enzimas colagenasas.¹¹⁻¹³

Fase de inversión: Después de la resorción mediada por osteoclastos, las lagunas de Howship permanecen cubiertas con una matriz de colágena desmineralizada. Una célula mononuclear de linaje indeterminado elimina estos restos de colágena y prepara la superficie ósea para la posterior formación ósea mediada por osteoblastos.¹⁰⁻¹³

Fase de formación: Los factores de crecimiento que fueron liberados de la matriz actúan como quimiotácticos y agrupan a los preosteoblastos en las zonas de resorción. Los preosteoblastos sintetizan una matriz con alta expresión de BMPs, responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados sintetizan la matriz osteoide que rellenará las zonas.^{11,13}

Fase de terminación: Cuando se ha reemplazado una cantidad igual que la de hueso resorbido, concluye el ciclo de remodelación.^{11,13}

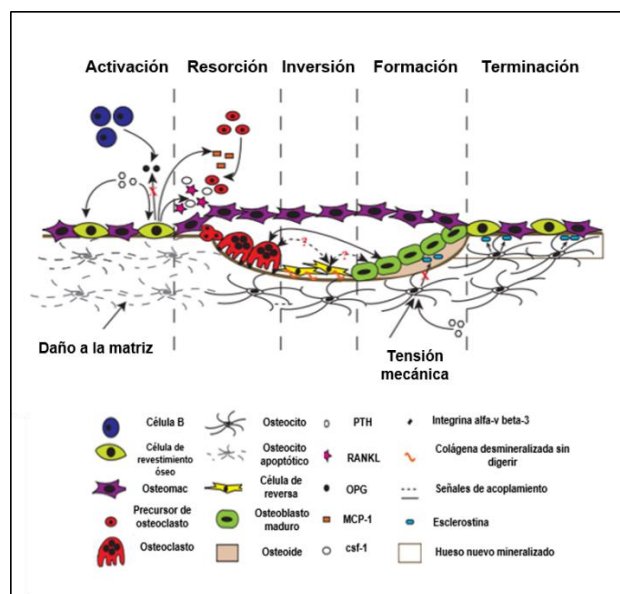


Figura 6. Esquema del proceso de remodelación ósea.¹¹

Cuando se presenta una agresión en el tejido óseo, el organismo empieza a realizar un remodelado donde participan los osteoclastos y osteoblastos, produciendo un nuevo hueso.¹⁹

Cuando un hueso resulta fracturado, se inicia un proceso reparativo que involucra varias respuestas a nivel tisular y celular. La respuesta inicial a la fractura ósea es la destrucción del tejido y hemorragia. Inicialmente, se forma un hematoma de fractura y necrosis en los extremos de los fragmentos del hueso lesionado.^{1,13}

La lesión hacia los tejidos blandos y la activación de plaquetas inician la secreción de citocinas y de una respuesta inflamatoria aguda. Este proceso se evidencia por la infiltración de los neutrófilos seguida por la migración de macrófagos, que se encargan de degradar el tejido dañado. A continuación, los fibroblastos y los capilares proliferan y crecen en el sitio de la lesión. Además, las células troncales mesenquimales llegan a la lesión desde los tejidos blandos circundantes y la médula ósea. El hematoma de fractura, que en un principio contenía eritrocitos atrapados dentro de una red de fibrina, se sustituye en forma gradual por tejido de granulación. Tanto los fibroblastos como las células del periostio participan durante esta fase.^{3,13}

A medida que el tejido de granulación se vuelve más denso, las células del periostio se diferencian en condroblastos y producen una matriz cartilaginosa que invade la periferia del tejido, produciendo un callo blando de fibrocartilago que contribuye a estabilizar el hueso fracturado.¹³

Las células osteoprogenitoras del periostio se dividen y se diferencian en osteoblastos que comienzan a depositar matriz osteoide en la superficie exterior del callo (osificación intramembranosa) a poca distancia de la fractura, reemplazando gradualmente el callo blando fibrocartilaginoso por un callo duro que permite soportar mayores cargas funcionales.^{3,10,13} El cartilago del callo original se mineraliza y es reemplazado por tejido óseo (osificación endocondral). En la cavidad medular comienzan a proliferar y diferenciarse células del endostio y el hueso crece desde ambos extremos de la fractura hacia el centro. Cuando este hueso se une, la unión ósea del hueso fracturado, producida por los osteoblastos y derivada tanto del periostio como del endostio, consiste en hueso esponjoso. Al igual que en la osificación fisiológica, el hueso esponjoso se reemplaza gradualmente por hueso compacto. Mientras se está formando hueso compacto, se eliminan los restos del callo duro por la acción de los osteoclastos y el remodelado óseo gradual restaura el hueso a su forma original.¹³ En la Figura 7 se resume el proceso de reparación ósea tras una fractura.

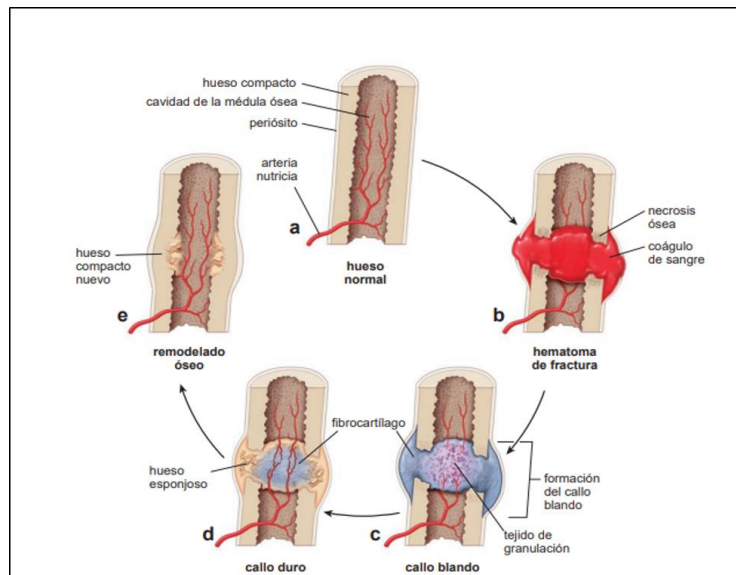


Figura 7. Esquema de la cicatrización ósea después de una fractura.¹³

En sistemas biológicos, estos procesos altamente regulados se encuentran asociados a la capacidad de regeneración del hueso, por lo que, un desbalance en el equilibrio dinámico entre la pérdida y formación del tejido óseo, asociado a diversos factores etiológicos (como traumatismos, procesos infecciosos, osteoporosis, osteopenia, quistes o tumores, entre otros) pueden conllevar a una significativa pérdida de densidad o masa ósea; donde el proceso de reparación y/o regeneración ósea implica una expresión regulada de genes y proteínas que resultan en diversas respuestas a nivel histológico, molecular, bioquímico y biomecánico.^{19,25-27}

Es importante reconocer que, en la reparación del hueso, no se restaura totalmente la arquitectura, función, propiedades y características del tejido dañado, es decir, es reemplazado por un tejido de otras características.^{25,26} En algunos casos, el proceso de restauración tiende hacia la creación de un tejido similar al original y no hay diferencia alguna con el tejido circundante, en este caso se habla de regeneración del tejido. Es precisamente esta diferencia entre reparación y regeneración lo que nos lleva a estudiar cuál es la fisiología de los tejidos óseos para conseguir la regeneración.^{19,15}

La regeneración es un proceso biológico mediante el cual la estructura y función del tejido perdido quedan restaurados por completo. La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células, y la MEC; se relaciona con los siguientes mecanismos: la osteogénesis, la osteoconducción y la osteoinducción.²⁸ En la Tabla 3 se describen estos mecanismos.

Mecanismo	Descripción
Osteogénesis	Proceso a través del cual se forma tejido óseo. Se lleva a cabo por las células encargadas de generar hueso (osteoblastos). La fuente de estas células son los injertos óseos autólogos.
Osteoconducción	Proceso por el cual se provee una estructura y un microambiente adecuado para la aposición de tejido óseo. Se lleva a cabo mediante una guía o matriz que permite el depósito de hueso nuevo.
Osteoinducción	Proceso que permite promover la diferenciación de células mesenquimales a través de proteínas, moléculas o iones en una línea de células osteoblásticas, facilitando el desarrollo del tejido óseo.

Tabla 3. Descripción de los mecanismos para la regeneración ósea.²⁸⁻³⁰

Para promover esta nueva generación de tejido óseo existen diferentes materiales que pueden ser utilizados como injertos o implantes. Los autoinjertos son injertos transferidos de una posición diferente dentro del mismo individuo, obtenidos de un sitio donante; los aloinjertos son injertos transferidos de otro individuo de la misma especie, pero diferente código genético; los xenoinjertos son injertos tomados de un donador de diferente especie y los materiales aloplásticos son materiales sintéticos o inorgánicos utilizados como injertos óseos.²⁹

Actualmente se han desarrollado diversas alternativas terapéuticas con la finalidad de restablecer no solo la estructura sino las características fisicoquímicas y mecánicas del tejido perdido.^{2,30-32} Se han realizado muchas investigaciones buscando el material ideal para el tratamiento de defectos óseos, siendo considerado el injerto óseo autógeno (autoinjerto) el estándar de oro en la regeneración ósea debido a sus propiedades osteogénicas, osteoconductoras y osteoinductoras. Sin embargo, los riesgos que implica su recolección al necesitar de una cirugía secundaria ha llevado al desarrollo de la ingeniería de tejido óseo (ITO) en un intento de encontrar un material que pueda proporcionar un entorno adecuado para el crecimiento tanto de hueso como de vasos sanguíneos *de novo*.³³⁻³⁵

Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos (IT) es una disciplina que se encarga del uso de andamios de distintos biomateriales que pueden ser a base de polímeros, cerámicas o metales para la colocación de células y moléculas o factores de crecimiento, teniendo como objetivo la restauración de tejidos, así como la restauración de sus funciones.^{30,36} Es considerada como una alternativa para la regeneración y formación de nuevos tejidos a través del uso de estructuras tridimensionales o matrices enriquecidas realizadas en laboratorios.^{6,30}

La IT se basa en el estudio, entendimiento y conjunción de tres elementos clave: a) andamios, b) células y c) factores inductivos (Figura 8).⁷

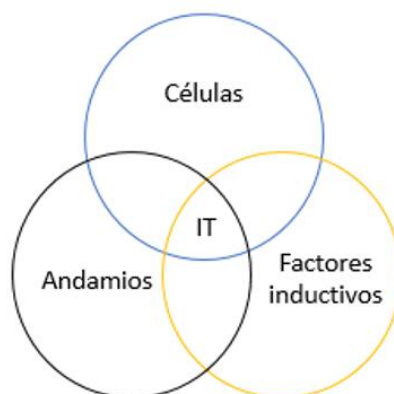


Figura 8. Triada de la IT.⁷

Los andamios son biomateriales y matrices de apoyo, que proporcionan una estructura tridimensional como sustento para tejidos o células específicas que, además de proporcionar el apoyo mecánico, deben brindar metabolitos o moléculas indispensables para el tejido en desarrollo. Deben replicar el microambiente celular del tejido natural para llevar a cabo una adecuada regulación, adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular. Las características de los andamios varían de acuerdo al tejido que se busca recuperar, pero en general deben incluir características biomecánicas, porosidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad y ser superficies que faciliten la adhesión y diferenciación celular (Tabla 4).²⁹

Características del andamio	Características deseables
Propiedades mecánicas	<ul style="list-style-type: none"> ● Resistencia a la compresión y a la fatiga similar al tejido del huésped; que permita la mecanorregulación celular y que la integridad estructural permanezca <i>in vivo</i>. ● Fácil manipulación en el entorno clínico.
Arquitectura de andamios	<ul style="list-style-type: none"> ● Poros interconectados que permitan la difusión y la migración celular. ● Microporosidad para presentar una gran área de superficie para interacciones célula-andamio. ● Macroporosidad para permitir la migración celular y la invasión de la vasculatura.

Biocompatibilidad	<ul style="list-style-type: none"> ● Componentes del andamio no inflamatorios. ● Productos de degradación no tóxicos. ● Compatible con el microambiente celular.
Biodegradabilidad	<ul style="list-style-type: none"> ● Degradable por procesos enzimáticos o biológicos del huésped. ● Permitir que las células huésped produzcan su propia MEC.
Bioactividad	<ul style="list-style-type: none"> ● Propiedades osteoconductoras y osteoinductoras.

Tabla 4. Resumen de las propiedades deseables de un andamio.^{7,8,17,29,37}

Un biopolímero natural que ha tomado popularidad es el quitosano, el cual es obtenido de la desacetilación de la quitina y que ha demostrado ser eficiente en terapias regenerativas. La quitina es uno de los polisacáridos nitrogenados naturales más abundantes en el mundo, siendo el segundo polímero con mayor disponibilidad en el medio marino después de la celulosa. Es derivada del exoesqueleto de animales marinos.³⁶ Está formada por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β 1-4, considerada químicamente inerte e insoluble al agua y a solventes orgánicos.^{17,39} A pesar de que la quitina muestra características funcionales como actividad antimicrobiana, actividad hemostática, biocompatibilidad y biodegradabilidad, tiene un uso limitado debido a su baja solubilidad.³⁸ La desacetilación conduce a su principal derivado, el quitosano, el cual es soluble en medios ácidos. Aunado a la desacetilación, los grupos amino libres de los residuos de D-glucosamina del quitosano pueden ser protonados y proporcionar una mejor solubilidad (Figura 9). Con los grupos amino protonados, el quitosano se convierte en un polication y posteriormente puede formar complejos iónicos con una amplia variedad de especies aniónicas naturales o sintéticas, por ejemplo, ADN, proteínas, lípidos o polímeros sintéticos.⁴⁰

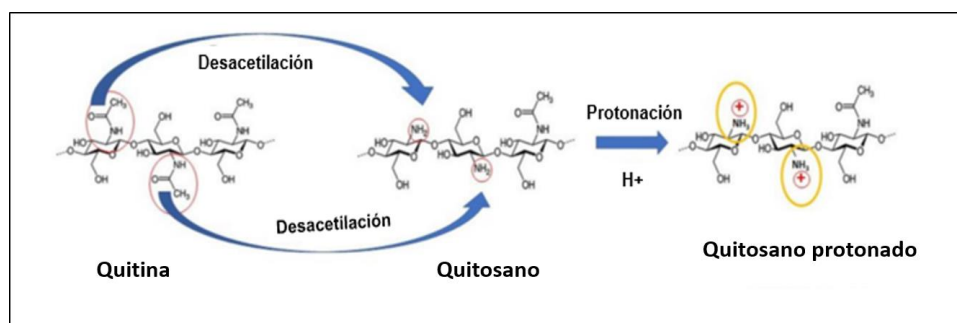


Figura 9. Estructura molecular de la quitina, el quitosano y el quitosano cargado positivamente.⁴⁰

El peso molecular del quitosano oscila entre los 10 a 1000 kDa. Como polímero natural, el quitosano posee propiedades favorables para su aplicación en la IT, siendo un andamio capaz de interactuar con las células sin desencadenar reacciones de citotoxicidad o una respuesta inmunitaria; tiene una estructura y composición similar a los GAG y, por lo tanto, provoca una respuesta inmunitaria mínima cuando se implanta en el cuerpo humano.^{41,42} Es metabolizado por enzimas humanas, como la lisozima, por lo que es un material biodegradable. La desacetilación implica el tratamiento de la quitina con hidróxidos a altas temperaturas, generalmente por encima de los 80°C. El grado de desacetilación es un factor importante para la determinación de sus características: menor grado de desacetilación favorece a la formación de menores poros, obteniendo mejor resistencia mecánica, absorción moderada de agua y mayor actividad celular en comparación con andamios producidos con altos grados de desacetilación. Como andamio, el quitosano puede ser utilizado en combinación con satín, un hemostático a base de fibras de celulosa. Al entrar en contacto con sangre o líquido tisular, el satín forma un coloide de elevada viscosidad, que promueve la hemostasia.^{23,38,39}

Aunado a los andamios, se han empleado diversos fenotipos celulares y una gran variedad de moléculas o factores de crecimiento con la finalidad de replicar las señales moleculares que promueven la proliferación y diferenciación celular, que al ser probados en entornos *in vivo* y/o *ex vivo* han permitido el desarrollo de alternativas regenerativas prometedoras. Una estrategia comúnmente empleada es la evaluación del llenado de defectos de tamaño crítico, cuya principal característica es de tener un tamaño que limita su capacidad de autorregeneración.^{36-39,43} En la IT, las células son el pilar fundamental. Deben tener la capacidad de proliferar y crecer en cultivos, entre las cuales destacan las células troncales.

Las células troncales son células primitivas que se encuentran indiferenciadas, con la capacidad de multiplicarse, crecer y diferenciarse en células de diferentes linajes como las que están presentes en la formación de hueso.⁴³ El microambiente *in vivo* que rodea a las células es rico en señales endocrinas, neurológicas, moleculares, iónicas, así como una gran variedad de proteínas y nucleótidos que contribuyen a llevar a cabo funciones celulares específicas. La IT busca replicar estas señales o moléculas para promover la proliferación y diferenciación celular.⁴³

En el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados han centrado su objeto de investigación en el cemento radicular, un tejido conectivo especializado de origen ectomesenquimatoso que forma parte de los tejidos de soporte del diente, recibiendo a las fibras del ligamento periodontal (fibras de Sharpey) para mantener la inserción del diente en su alveolo.^{23,44-47} Se trata de un tejido mineralizado que recubre la superficie radicular de los dientes, que además de mantener su inserción, participa en la distribución de las fuerzas masticatorias, mantiene el espacio del ligamento periodontal y la relación oclusal estable al compensar la atrición dental.^{5,6,47} El cemento radicular se clasifica de acuerdo a su localización, así como la presencia/ausencia de células y fibras.^{5,6} En la Tabla 5 se describen de manera general los diferentes tipos de cemento.

Tipos de cemento	Localización	Descripción
Cemento acelular afibrilar	Se encuentra como cemento coronario.	Es una matriz mineralizada sin contenido de fibras de colágena, producto de los cementoblastos. Rico en GAG. Espesor de 1-15 µm.
Cemento celular mixto estratificado	Bifurcaciones o trifurcaciones. Tercio apical. Ápice radicular.	Conformado por una matriz y fibras de colágena intrínsecas y extrínsecas (de Sharpey), coproducto de cementoblastos y fibroblastos. Tiene la capacidad de reparar un defecto de resorción de la raíz a corto plazo. Espesor de 10-1000 µm.

Cemento acelular con fibras extrínsecas	Tercio cervical y medio de la raíz (cubre aproximadamente el 40-70% de la superficie radicular total).	Se compone fundamentalmente de fibras colágenas y proteínas no colágenas; producto de cementoblastos y fibroblastos. Las fibras extrínsecas (de Sharpey) se disponen perpendicularmente a la superficie de la raíz con un diámetro de 3-6 μm . Espesor de 50-200 μm (30-230 μm para algunos autores).
Cemento celular de fibras intrínsecas	Lagunas de resorción.	Contiene células, pero no fibras de colágena extrínsecas. Está formado por cementoblastos.
Cemento intermedio	Zona mal definida cerca de la unión cemento-esmalte.	Contiene restos celulares de la vaina epitelial de Hertwig incluidos en una sustancia fundamental calcificada.

Tabla 5. Tipos de cemento.^{5,6,47}

El cemento comparte mucha similitud en cuanto a composición química con el hueso. Su componente inorgánico principal (50%) son cristales de HA, con la presencia de fosfatos de calcio amorfos y elementos en pequeñas cantidades de magnesio, cobre, zinc y sodio; el componente orgánico se constituye principalmente de colágena tipo I (90%), III (5%), glucoproteínas (BSP y OPN), proteoglucanos y agua (5%).^{5,16,45}

Se ha demostrado que el cemento radicular juega un papel fundamental en la regeneración periodontal, por lo que se ha extendido el estudio de las proteínas presentes en el mismo.^{14,44,46}

La proteína de adhesión del cemento (CAP) fue la primera proteína aislada del cemento radicular. El gen que codifica esta proteína se encuentra presente en el cromosoma 10p13-p14. Se constituye por 140 AA y su estructura secundaria presenta conformaciones desordenadas o aleatorias (45.9%) y alfa hélices (43.2%). Esta proteína participa en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación del cemento radicular. Se expresa en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación.^{23,44-47}

Además, las células periodontales crecidas, *in vitro*, en presencia de CAP son capaces de formar un tejido mineralizado.¹⁴ Por lo anterior, se comenzó a plantear el uso de esta proteína dentro de la IT como factor inductivo para la regeneración ósea. Sin embargo, debido a que el uso de proteínas presenta desventajas en comparación al uso de péptidos (pequeñas secuencias de AA) como mayor costo para su síntesis, menor especificidad y que su uso en sistemas biológicos puede desencadenar una respuesta de defensa por parte del organismo por su estructura tridimensional, se ha optado por investigar y hacer uso de secuencias peptídicas para este fin. Se ha encontrado que CAP se trata de una isoforma de la proteína 3-hidroxiacil-CoA-deshidratasa 1 (la cual se conforma por 288 aminoácidos y participa en el metabolismo de los lípidos) cuya diferencia entre ambas macromoléculas peptídicas radica en los últimos 15 aminoácidos. El cambio de estos aminoácidos se presenta en su sitio de actividad, modificando la porción C-terminal por la secuencia de VSFPSCCF SIAVIFM (CAP-p15),^{46,47} por lo que se comenzó a usar el péptido CAP-p15, proveniente de esa última secuencia de AA, como opción alternativa en lugar del uso de la proteína completa. CAP-p15 es un péptido de naturaleza ácida e hidrofóbica; con base a un análisis *in silico*, posee un punto isoeléctrico teórico de 5.48 y un peso molecular de 1.65 kDa.⁴⁷ Estudios en sistemas libres de células, han demostrado que tiene la capacidad de promover la formación de cristales de HA y estudios *in vivo* que promueve la formación de tejido un tejido mineral *de novo* en defectos de tamaño crítico en calvaria de rata y tibias de conejo.⁴⁴⁻⁴⁶ En la Figura 10 se muestra la secuencia de AA que conforman CAP y se resalta la porción C-terminal.

10	20	30	40	50
MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTING
60	70	80	90	100
GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME
110	120	130	140	
KGTHRGLYKS	IQKTLKFFQT	FALLEVSFPS	CCFSIAVIFM	

Figura 10. Secuencia de CAP.⁴⁷

Estudios previos en el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados han permitido la caracterización de proteínas presentes en la matriz del cemento radicular e incluso se han identificado secuencias peptídicas que logran emular algunas de las funciones observadas en dichas biomoléculas.^{23,44-47}

Los resultados de las investigaciones realizadas en este laboratorio, ha permitido establecer una estrategia metodológica donde a partir del empleo de andamios sintetizados de quitosano y en combinación con péptidos derivados de las proteínas de la matriz del cemento radicular se ha logrado observar la neoformación de un tejido mineralizado similar al hueso.

Caracterización de tejidos

La caracterización de los tejidos neoformados involucra el empleo de metodología y tecnología que permita identificar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del nuevo tejido. La histomorfometría es uno de los métodos histológicos convencionales que permite la valoración del tejido óseo, permitiendo un análisis cuantitativo de las estructuras óseas, así como obtener información sobre la resorción y formación de tejido mineralizado.^{40,41,48} Permite la observación de patrones relacionados con la regeneración ósea, como la presencia de reacción inflamatoria, tejido conectivo, osteoblastos, osteonas/sistemas de Havers, frentes de mineralización, osteocitos, vascularización, osteoclastos y matriz osteoide.^{49,50}

Para llevar a cabo la evaluación de un tejido o muestra usualmente se realizan tinciones que permiten identificar y visualizar sus estructuras. La tinción Tricrómica de Masson (TM) es una técnica selectiva de coloración especial que permite visualizar las fibras de colágena, las fibras reticulares y comparar con células musculares y epitelios. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágena (Tabla 6).^{1,13}

Color	Resultados
Café oscuro	Núcleos
Rojo	Citoplasma, músculos, queratina, tejido mineralizado
Azul	Fibras de colágena y mucígeno

Tabla 6. Interpretación de la tinción TM.^{1,13}

Otra técnica ampliamente empleada en la caracterización tisular es la inmunofluorescencia (IF), la cual nos permite detectar componentes (*in situ*) tanto celulares como extracelulares mediante el uso de anticuerpos específicos acoplados a enzimas o colorantes fluorescentes (fluorocromos). Los fluorocromos más utilizados en las técnicas de IF son la fluoresceína (emite luz verde), la rodamina (emite luz rojo-anaranjado) y la ficoeritrina (emite luz roja). Los anticuerpos conjugados con el fluorocromo se pueden aplicar a cortes de tejidos fijados en portaobjetos de vidrio para localizar un antígeno determinado a estudiar. La reacción del anticuerpo con el antígeno puede examinarse con un microscopio de fluorescencia.¹³ Particularmente, en la regeneración ósea, esta técnica nos permite identificar la presencia de proteínas y marcadores relacionadas con la síntesis, formación e inhibición de hueso como BMPs, BSP, OCN, OPN, ALP y factores de crecimiento en el tejido neoformado.⁵⁰

En este trabajo, se llevó a cabo la caracterización del tejido neoformado por el péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP-p15) en combinación con andamios de quitosano, por medio de histomorfometría e inmunofluorescencia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El equilibrio dinámico entre la pérdida y formación del tejido óseo puede alterarse por traumatismos, procesos infecciosos, enfermedades como osteoporosis, osteopenia, quistes o tumores, generando defectos óseos más allá de un tamaño crítico que el cuerpo no puede regenerar. Hasta el día de hoy, el tratamiento de estos defectos con mejores resultados ha sido el injerto autólogo, sin embargo, su obtención y desventajas ha llevado a buscar nuevas estrategias que sean capaces de sustituir su uso y conseguir resultados equiparables en la regeneración de hueso.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la IT constituye un área de importancia médica que se ha enfocado en el descubrimiento de biomateriales que tengan la capacidad de ser utilizados en la regeneración de tejidos. Se ha demostrado que el uso de andamios de quitosano en combinación con péptidos biofuncionales podrían actuar como agentes anabólicos en la regeneración de tejidos mineralizados. Sin embargo, es importante contar con la caracterización de los tejidos neoformados para determinar si constituyen una opción terapéutica real en el área médica y odontológica.

Los estudios que evalúan la calidad de hueso neoformado, tienen como objetivo medir y observar el porcentaje de formación de hueso nuevo, el porcentaje de partículas o material (injerto-biomaterial) usado, la presencia de tejido conectivo y el porcentaje de hueso neoformado con partículas del material residual remanente del injerto. Todo lo anterior, a partir de muestras tomadas en el momento de la colocación del material.

El propósito de este trabajo es obtener datos mediante el análisis histomorfométrico y los ensayos de inmunofluorescencia, que nos brinde información acerca del proceso de regeneración ósea mediado por la combinación de un andamio de quitosano y el péptido CAP-p15.

HIPÓTESIS

El empleo de la combinación del péptido CAP-p15 con un andamio de quitosano en defectos críticos de calvaria de ratas promueve la formación de tejido óseo.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si el tejido neoformado por la combinación del péptido CAP-p15 con un andamio de quitosano en defectos críticos de calvaria de ratas es tejido óseo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar mediante histomorfometría las características y el porcentaje de formación ósea que presenta el tejido neoformado.
- Identificar mediante técnicas de inmunofluorescencia la expresión de proteínas óseas (BMP-2, BSP, OCN y ALP) en el tejido neoformado.

METODOLOGÍA

Estudio experimental. En la Tabla 7 se describe cada variable y su escala.

Variables independientes	Variables dependientes	Variable	Escala
-Defecto óseo crítico -Tiempo	-Formación de tejido fibroso	Continua	Razón
-Presencia o ausencia del péptido	-Formación de tejido óseo	Dicotómica	Nominal

Tabla 7. Descripción de variables.

SÍNTESIS DEL PÉPTIDO.

La síntesis del péptido bioactivo se llevó a cabo a partir de la técnica de Sheppard para la síntesis de péptidos en fase sólida (Fmoc), el grado de pureza (>90%) se determinó a partir de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); dicha síntesis se solicitó a la casa comercial NEP (New England Peptide).

PREPARACIÓN DE ANDAMIOS DE QUITOSANO.

Se preparó una solución de quitosano al 1% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v) y se filtró por una membrana de 0.22 μm . De esta solución, se depositó una cantidad en cajas de 46 pozos y se congelaron a -20°C durante toda la noche. Posteriormente se liofilizaron los discos formados. En una campana de flujo laminar y con ayuda de un sacabocado se obtuvo los andamios de 9 mm de diámetro.

Se dividieron los discos en dos grupos: 1) grupo control sin péptido y, 2) grupo experimental al cual se les colocaron 20 μg del péptido CAP-p15. Los andamios con el péptido se desecaron en una cámara de vacío a temperatura ambiente. Los andamios fueron esterilizados mediante luz UV.

SELECCIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

Los procedimientos y especificaciones técnicas, así como el empleo y cuidado de animales de laboratorio se realizaron de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y cuenta con la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Odontología (CICUAL-FO-M001-0011-2021).

Se utilizaron 6 ratas machos de la cepa Wistar de 18 semanas (250 g de peso) obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se excluyeron aquellos animales de laboratorio con enfermedades sistémicas, lesiones tisulares o con un peso menor a los 250 g. Se eliminaron aquellas ratas que desarrollaron enfermedades óseas, infección tisular y muerte por causas no consecuentes al estudio (enfermedades infectocontagiosas), las cuales fueron evaluadas por un Médico Veterinario Zootecnista.

Las ratas machos seleccionadas para esta investigación se dividieron, aleatoriamente, en dos grupos de 3 animales cada uno de ellos: grupo control (se realizó el defecto de tamaño crítico de 9 mm diámetro + Quitosano + Satín) y grupo experimental (se realizó el defecto de tamaño crítico de 9 mm diámetro + Quitosano + 20 µg CAP-p15 + Satín). En la Tabla 8 se describe cada uno de los grupos.

Grupo	Abreviatura	Tiempo	Número de animales
Control con Quitosano	Q	4 meses	3 cada grupo
Experimental con péptido biofuncional	CAP-p15		

Tabla 8. Descripción de grupos.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Las ratas fueron sedadas y tranquilizadas con Ketamina (80 mg/Kg) y Xilacina (10 mg/Kg), ambas por vía intramuscular. La zona del cráneo se preparó y cubrió en condiciones estériles. Se aplicó anestésico en la zona quirúrgica con mepivacaína y epinefrina, y se realizó una incisión lineal de 3 cm a través de la piel y el periostio de la calvaria hasta exponer el vértice craneal. Para la realización del defecto de tamaño crítico, se empleó una trefina con un diámetro de 9 mm (tamaño del defecto), montado en un motor de implantes a 4,000 rpm y con irrigación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril; posteriormente, se realizó el clivaje del fragmento óseo (sin dañar la duramadre), se lavó la zona con PBS estéril para remover detritus, y en el sitio quirúrgico se colocó el andamio que correspondía a cada grupo. La herida se cerró con sutura continua de ácido poliglicólico 4-0. Se realizó el seguimiento clínico posquirúrgico, valorándose el estado general del animal, aspecto de la herida y de la zona intervenida, sangrado, exudado o colecciones o extrusión de los biomateriales. Las ratas se alimentaron *ad libitum*.

Al finalizar un periodo de 4 meses, los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂: se introdujeron en una cámara con exposición prolongada a CO₂ hasta llegar al paro cardiorrespiratorio. Se realizó la osteotomía de la calvaria de la zona del defecto con pieza de rotación e irrigación constante de H₂O desionizada estéril.

Se realizó un corte en la periferia del defecto con un margen de 10 mm. La muestra se lavó y se fijó en paraformaldehído al 10% durante 24 horas.

PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.

Una vez fijadas las muestras, se lavaron con H₂O desionizada para eliminar exceso de paraformaldehído y se descalcificaron en una solución de formaldehído al 10% con ácido nítrico al 5% por 60 horas. Al finalizar la descalcificación, se procesaron para ser embebidas en parafina y obtener cortes secuenciales de 5 µm de grosor. Los cortes secuenciales fueron teñidos con tinción TM para la histomorfometría y otros cortes se dejaron en blanco para el ensayo de IF.

La evaluación de las muestras se realizó mediante análisis histológico, con la finalidad de evaluar las zonas correspondientes a los bordes del defecto: se observaron los patrones de regeneración ósea, presencia de reacción inflamatoria, tejido conectivo, osteoblastos, osteonas/sistemas de Havers, frentes de mineralización, osteocitos, vascularización, osteoclastos y matriz osteoide.

HISTOMORFOMETRÍA

El análisis histomorfométrico se realizó en vistas panorámicas del tejido utilizando el software Zen Lite (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) donde se midió el área del tejido neoformado y se comparó contra el fragmento óseo que se obtuvo durante la cirugía, el cual se empleó como control (100%).

INMUNOFLUORESCENCIA

Se utilizaron cortes histológicos de calvaria de cada grupo Q y CAP-p15. Las laminillas se desparafinaron en xilol, se rehidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol etílico y se lavaron con PBS por 5 minutos. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-BMP-2, anti-BSP, anti-OCN y anti-ALP) a una dilución de 1:100 en PBS + 2 mg/ml de BSA y se incubaron toda la noche a 4°C. Las laminillas se lavaron en PBS + Tween20 al 0.01% por 5 minutos, seguido de otros dos lavados con PBS por 5 minutos cada uno.

Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución de 1:20 o Alexa Rojo a una dilución de 1:200, durante 2 horas a temperatura ambiente; las laminillas se lavaron con PBS + Tween20 al 0.01% por 5 minutos y después en PBS 2 veces más. Las laminillas se montaron y se observaron en un microscopio de IF indirecta Axiophot II (Zeiss, Alemania).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó una prueba t de Student para cada una de las variables a estudiar. Los análisis de ajustes de datos lineales y no lineales se llevaron a cabo empleando el programa GraphPad Prism™.

RESULTADOS

Al término de los 4 meses (post-quirúrgicos), con la finalidad de tener una visión integral del proceso de cicatrización/regeneración del defecto se realizó la tinción con Tricrómica de Masson de todas las muestras. Las imágenes reconstruidas nos permiten identificar la zona del defecto correspondiente a un diámetro de 9 mm delimitada por tejido óseo cortical. En el caso del grupo control se observa la interfaz de hueso/defecto con la presencia de una cicatrización de tipo fibroso, sin evidencia de reacción inflamatoria o de osificación; mientras que en el grupo experimental se observa la neoformación de un tejido osteoide con la presencia de una fuerte tinción positiva para colágena tipo I (Figura 11).

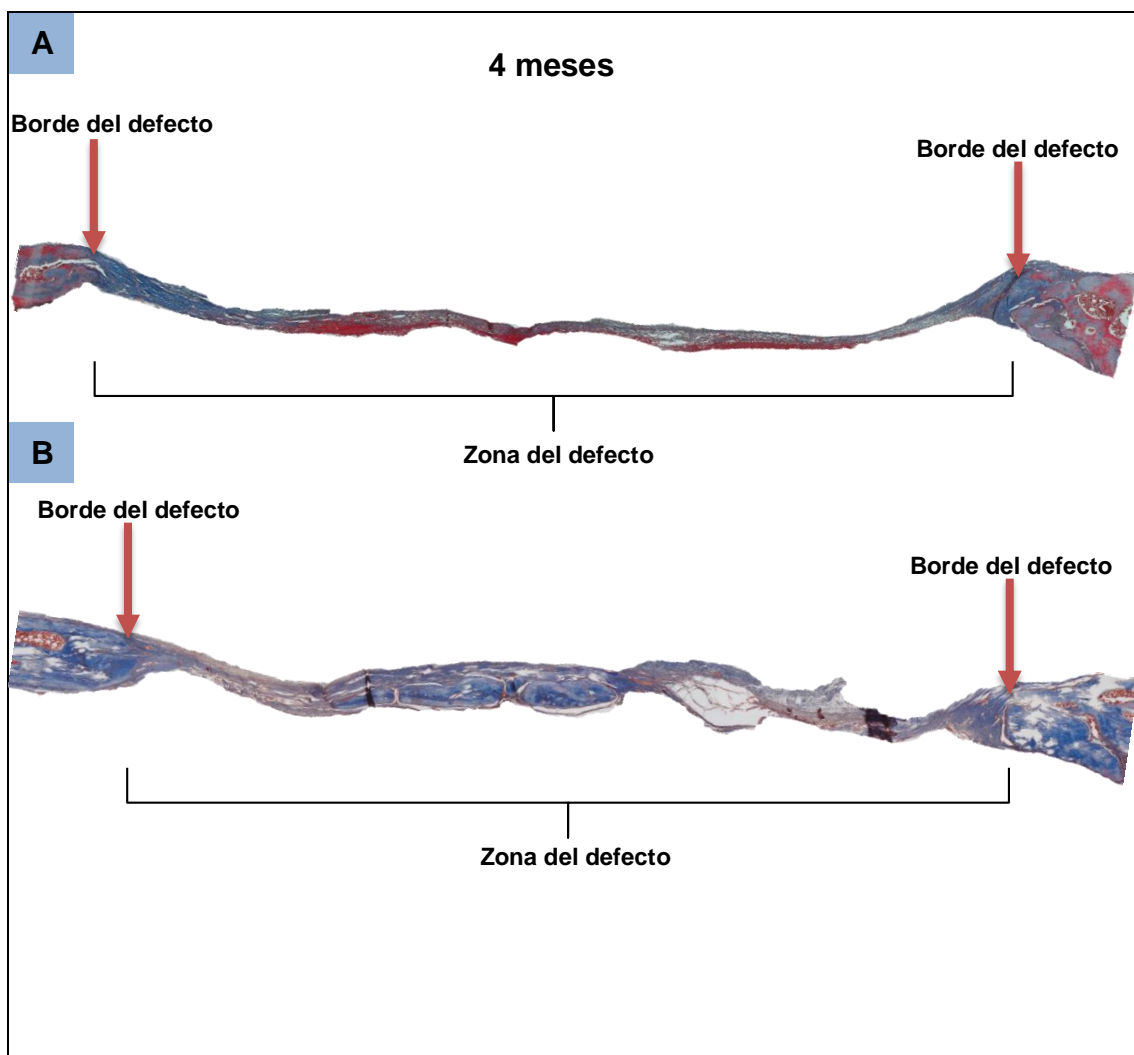


Figura 11. Fotomicrografías (10x) de las muestras teñidas con TM a los 4 meses postquirúrgicos.

A) Grupo control. B) Grupo experimental tratado con CAP-p15. Fuente propia.

En el grupo control (Q) se corroboró que los andamios de quitosano poseen muy buenas propiedades de biocompatibilidad ya que no se observó algún efecto tóxico o reacción inflamatoria. El análisis histológico de las muestras teñidas con TM nos permite identificar el tejido óseo cortical correspondiente a los bordes del defecto.

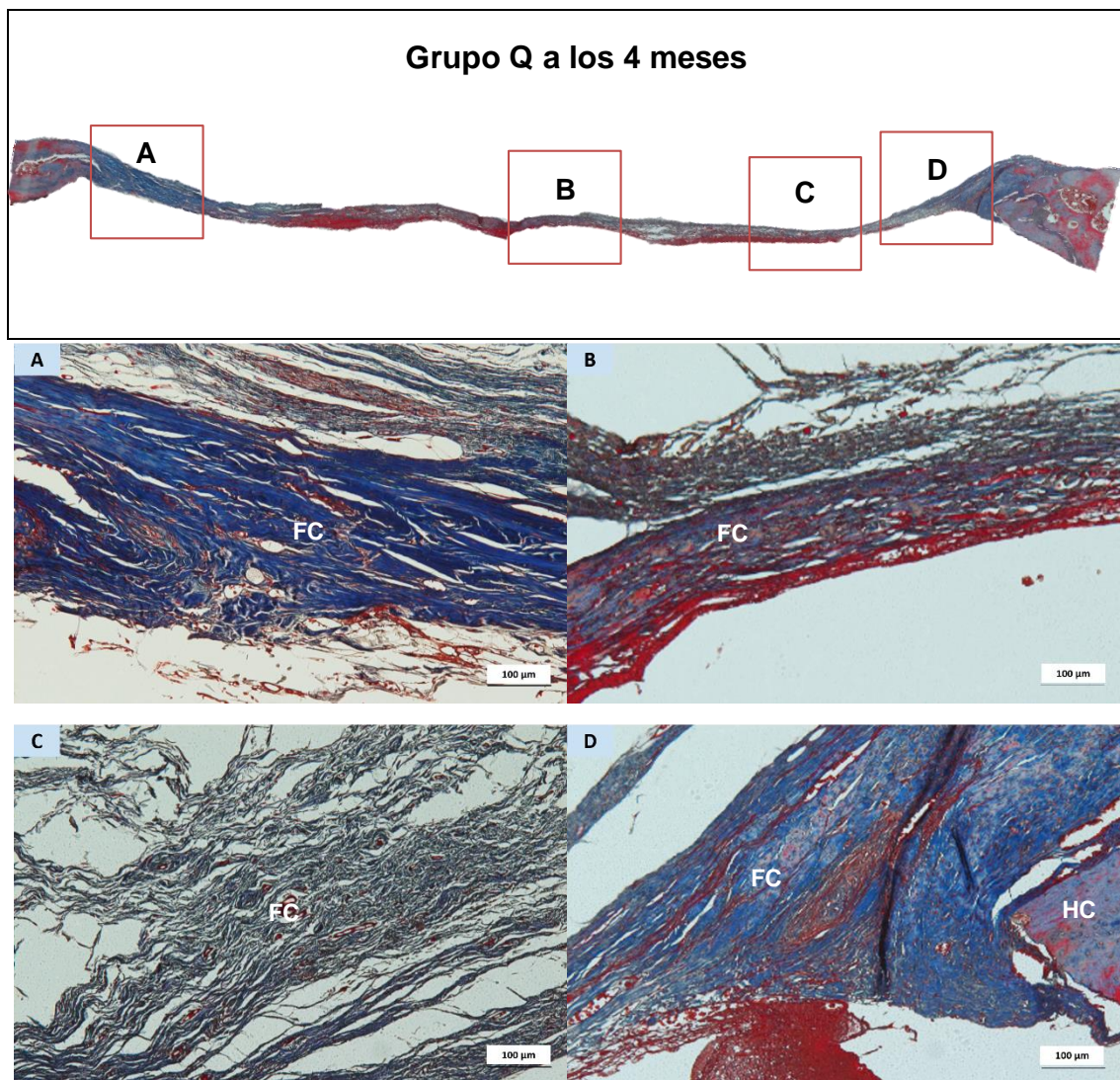


Figura 12. Fotomicrografías de la reconstrucción panorámica (10x) de calvaria de rata a los 4 meses del grupo Q teñida con TM. A) De acuerdo a la tinción se observa la presencia fibras con una disposición ordenada y regular que probablemente correspondan a colágena tipo I (FC) representadas de color azul. B) Imagen del centro del defecto. C) Se observa una disposición más desorganizada e irregular de las fibras. D) Se observan algunos haces de fibras bien organizadas adyacentes al borde del hueso cortical (HC). Fuente propia.

En la zona del defecto se observa el proceso de cicatrización con la presencia de una capa delgada de tejido conectivo denso que une los bordes del defecto. A mayor acercamiento, en el centro del defecto, podemos observar la presencia de fibras teñidas de coloración azul (presumiblemente de colágena) dispuestas de manera regular y entre las que se identifican algunos vasos sanguíneos.

Al realizar un análisis de toda la zona del defecto no se observó la presencia del andamio de quitosano, indicando su completa biodegradación antes de los 4 meses (Figura 12).

Por otro lado, la reconstrucción panorámica del corte histológico del grupo CAP-p15 nos permite identificar la presencia de tejido mineralizado neoformado, particularmente en la zona céntrica del defecto. No se aprecia la presencia de algún tipo de residuo del andamio de quitosano y más importante aún, no hay indicios histológicos de alguna respuesta inflamatoria.

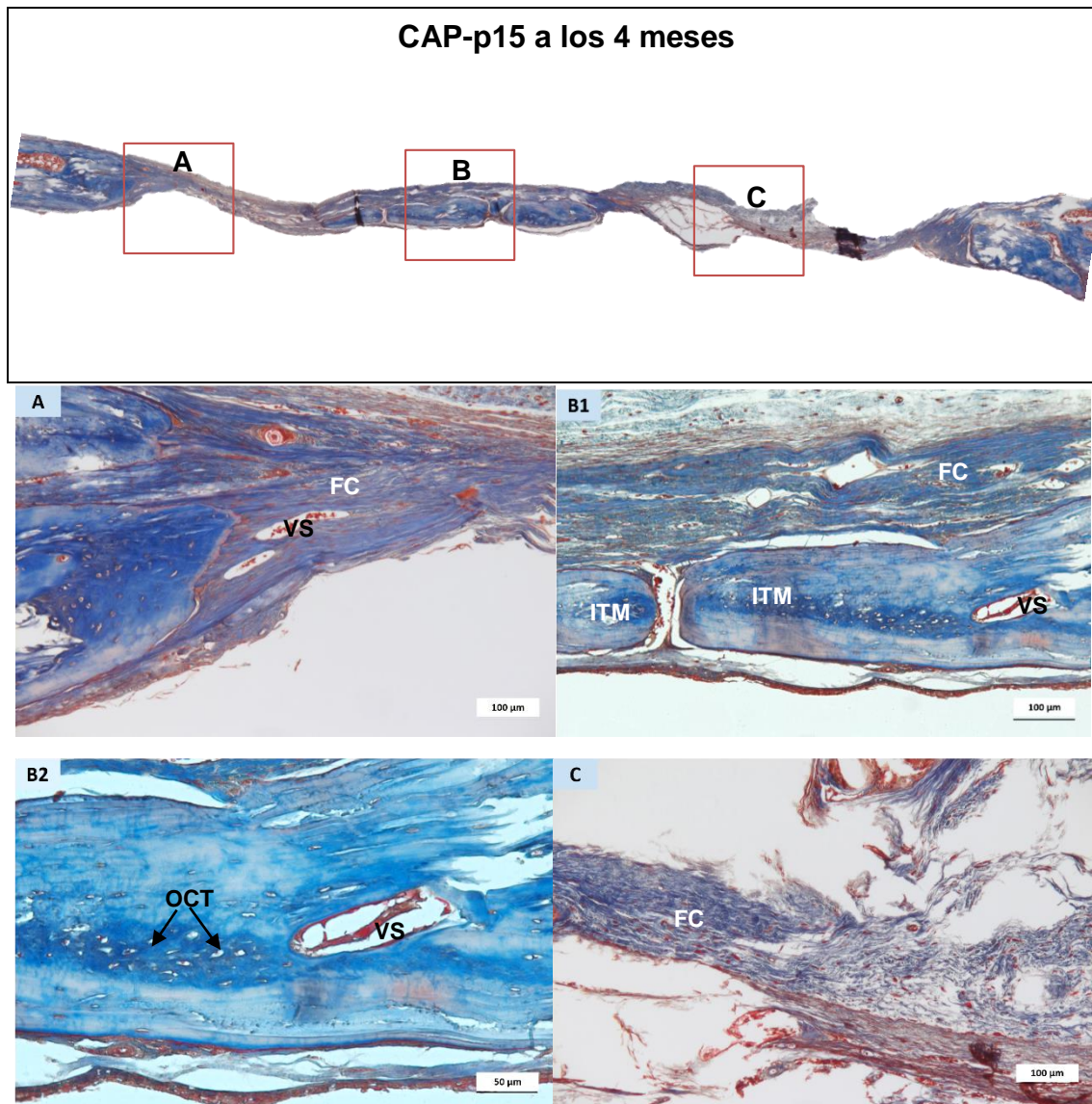


Figura 13. Fotomicrografías (10x) de diferentes zonas del defecto A) Borde del defecto con la presencia de fibras bien organizadas y presencia de vasos sanguíneos (VS). B1) Zona central del defecto donde observamos la formación de varias islas de tejido mineralizado (ITM) rodeadas por fibras de colágena (FC), las cuales dirigen el crecimiento mineral durante el proceso de biomineralización. La presencia de vasos sanguíneos nos indicaría que se trata de un tejido con vitalidad. B2) Acercamiento (20x) del tejido neoformado donde podemos apreciar osteocitos en sus lagunas (OCT), vasos sanguíneos, y neoformación ósea con evidencia (diferentes tonos del colorante azul y máculas rojas) de distinto grado de mineralización. C) Tejido conectivo denso que une los bordes del defecto sin presencia del quitosano. Fuente propia.

Al llevar a cabo un análisis más detallado de este tejido neoformado podemos identificar la actividad osteoblástica caracterizada por la presencia de osteocitos en sus lagunas, matriz osteoide en distintas fases de mineralización, así como también es posible observar la presencia de vasos sanguíneos, por lo que se podría tratar de un tejido óseo vital (Figura 13). Si consideramos que las fibras de colágena son esenciales para osteoblastogénesis, y su presencia se acompaña de zonas de mineralización con la presencia de vasos sanguíneos, podríamos afirmar que los andamios funcionalizados con CAP-p15 está dando lugar a la neoformación ósea. Además, los resultados obtenidos del análisis de histomorfometría de las muestras del grupo experimental tratado con el péptido indican una neoformación (relleno) del defecto de alrededor del 50% (Figura 14).

El análisis estadístico mostró una diferencia significativa del grupo CAPp-15 con respecto al grupo Q, demostrando que los andamios funcionalizados con CAP-p15 promueven la neoformación de tejido mineralizado.

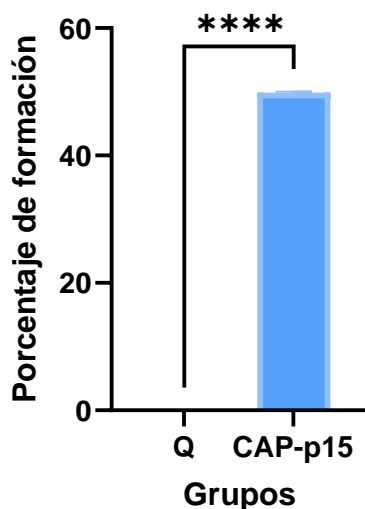


Figura 14. Gráfica que representa la formación de tejido mineralizado en los grupos de estudio, donde el grupo experimental muestra diferencia significativa (49.8%) respecto al control ($p < 0.0001$).

Para corroborar que los andamios de quitosano funcionalizados con CAP-p15 promueven la neoformación ósea, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia para identificar la expresión de marcadores osteogénicos (BMP-2, BSP, OCN, y ALP). Los resultados demuestran que las proteínas BMP-2, BSP, OCN, y ALP se expresaron en el tejido neoformado, asociadas a la presencia de osteocitos y osteoblastos en los cortes de las muestras del grupo CAP-p15, mientras que dicha expresión no fue observada en el grupo control. Particularmente, la expresión de la proteína BMP-2, considerada un potente inductor de la formación ósea, se observó alrededor de la matriz osteoide, cuya localización podría estar asociada a la presencia de nichos de células troncales mesenquimales donde podría estar regulando la diferenciación y maduración de osteoblastos con una función activa en la regeneración del hueso. Además, se puede observar la expresión de ALP alrededor de la matriz mineralizada y en zonas asociadas a la presencia de osteocitos; esta molécula se asocia a la diferenciación de células troncales hacia un fenotipo mineralizante. Aunado a la expresión de estos marcadores, en el grupo experimental observamos la expresión de la proteína BSP, cuya localización puede ser identificada en la periferia del tejido neoformado, así como en las islas de mineralización donde se asocia a la presencia de osteoblastos y osteocitos. Esta proteína se ha descrito que juega un papel importante en estadios iniciales: en la formación y crecimiento de los cristales de HA, así como también en etapas tardías durante la maduración de la matriz extracelular ósea. La OCN es un marcador asociado a la regulación del calcio, cuya expresión está asociada al depósito y maduración de la matriz mineralizada, lo cual explica su localización en la periferia y zonas de tejido neoformado por el efecto del andamio funcionalizado con CAP-p15 (Figura 15).

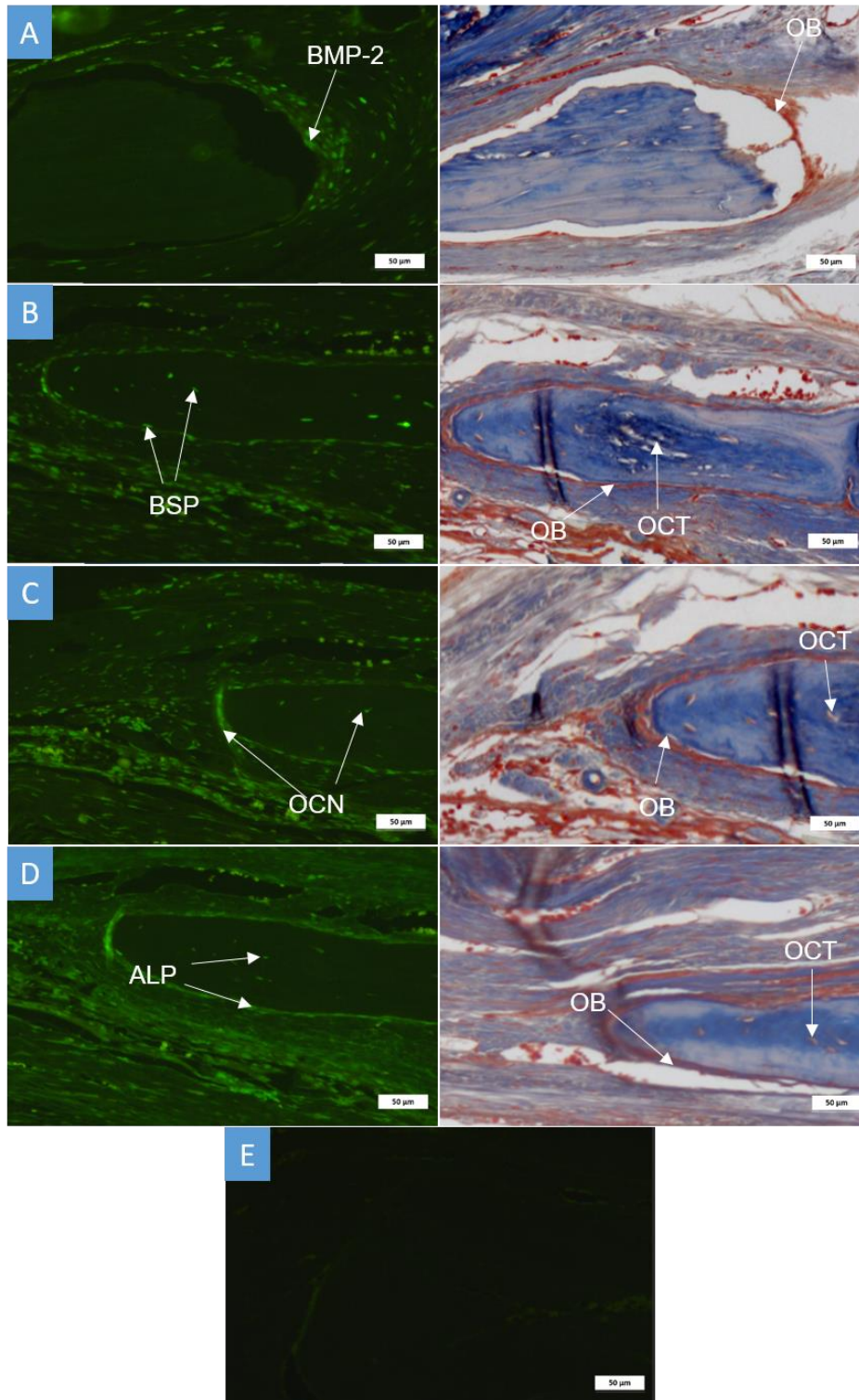


Figura 15. Inmunolocalización de marcadores óseos (FITC) en las muestras experimentales tratadas con CAP-p15. A) Expresión de BMP-2. B) Expresión de BSP. C) Expresión de OCN. D) Expresión de ALP. A la derecha de cada imagen de fluorescencia, se muestra la imagen histológica que se tomó como referencia de la zona analizada. E) Resultado negativo de la expresión de proteínas del grupo control. Fuente propia.

DISCUSIÓN

En sistemas biológicos, la regeneración ósea y biomineralización son procesos que requieren una expresión regulada de genes, y donde las proteínas juegan un papel crucial para la formación, crecimiento y maduración de la matriz mineralizada. La ITO busca replicar estos fenómenos usando como base andamios a los cuales se les ha incorporado moléculas que estimulan las señales moleculares asociadas a la regeneración tisular.^{2,7,8}

En este trabajo, empleamos andamios de quitosano biofuncionalizados con CAP-p15, con la finalidad de promover la regeneración ósea de defectos que por sí solos no cuentan con la capacidad de regenerarse. Los andamios que son utilizados en la IT tienen que brindar un área superficial adecuada para la adhesión, migración, comunicación, diferenciación, nutrición y vascularización de las células. En ese sentido, el quitosano ha demostrado ser un biomaterial no tóxico, biodegradable y con propiedades fisicoquímicas que le brindan su biocompatibilidad, por lo que se vuelve una muy buena alternativa para su aplicación clínica.^{40,42,51}

Los resultados obtenidos con el empleo del quitosano, como andamio, corroboran no solo su buena biocompatibilidad al no observarse algún tipo de reacción inflamatoria o efecto tóxico. Varios estudios destacan la actividad antioxidante del quitosano, debido a la capacidad de los grupos amino e hidroxilo para atrapar radicales libres y formar moléculas estables. Un dato relevante observado fue que el andamio mostró una completa degradación a los 4 meses, y que al ser combinado con un péptido biofuncional de naturaleza hidrofóbica no se alteró dicha propiedad, lo cual podría explicarse a la capacidad de establecer interacciones hidrofóbicas con moléculas no polares.^{40,52,53}

En estudios realizados por Meimandi et al., 2018 utilizaron andamios de quitosano para evaluar la regeneración ósea en defectos críticos en tibias de ratas. Sus investigaciones concluyeron que posee una buena biocompatibilidad, ya que, ante su análisis clínico e histológico, las muestras no presentaron infección ni necrosis; sin embargo, la cantidad de hueso neoformado sigue siendo inferior que al uso de injertos autólogos.⁵²

Estudios realizados por Chen et al., 2018, el quitosano utilizado en defectos de calvaria de ratas tuvo un efecto osteoconductor sobre la regeneración ósea *in vivo*, promoviendo la formación de tejido óseo desde el borde de la herida, aunado a una alta expresión de ALP a las 4 semanas de su implantación, postulando que el quitosano, con su unidad de N-acetil-D-glucosamina, puede unirse al factor de crecimiento de fibroblastos y, por lo tanto, estimular la angiogénesis y la proliferación de células similares a osteoblastos; sin embargo, en nuestro estudio el empleo de los andamios de quitosano mostraron la cicatrización del defecto caracterizada por la formación de tejido fibroso y la presencia de vasos sanguíneos.⁴¹ Esta propiedad del quitosano se asocia a su carga positiva natural, donde los grupos amino protonables interactúan electrostáticamente con las diversas proteínas con carga negativa en la superficie de los glóbulos rojos. Esta interacción aumenta la viscosidad de la sangre, activa la adhesión y agregación de plaquetas, y mejora el transporte de plaquetas a la pared vascular para la hemostasia fisiológica.⁴⁰

El uso de quitosano como andamio está limitado por tener actividad biológica y propiedades mecánicas reducidas. Esta desventaja se ha superado mezclando los andamios de quitosano con otros polímeros sintéticos o naturales (como policaprolactona, alginato, colágena o fibroína de seda), biomateriales (como HA, óxido de silicio o fosfato tricálcico) y moléculas farmacológicas bioactivas (como BMP-2, factor de crecimiento endotelial vascular o bifosfonatos). La combinación de quitosano con diferentes biomateriales y/o biomoléculas han sido reportados en diferentes estudios preclínicos, que demuestran la capacidad de promover la adsorción de proteínas acelerando el proceso de oseointegración de implantes dentales y en la reconstrucción de defectos óseos de tamaño crítico. Sin embargo, muchos de los andamios de biocompuestos publicados no pudieron disminuir la tasa de biodegradación del quitosano, lo que afecta su persistencia *in vivo* a largo plazo.⁴⁰

De acuerdo con el análisis histológico de las muestras tratadas con los andamios de quitosano funcionalizados con CAP-p15, observamos la neoformación de un tejido mineralizado óseo y vital, lo cual fue confirmado por la presencia de células óseas embebidas de una matriz mineralizada y la presencia de nuevos vasos sanguíneos. La inmunodetección de marcadores óseos como BMP-2, BSP, OCN, y ALP en las muestras experimentales nos confirman que el tejido neoformado se trata de hueso.^{15,23,54}

Estudios previos en el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados han reportados la formación de tejido óseo evaluado con técnicas histomorfométricas e inmunofluorescentes mediante el uso de andamios a base de alginato de sodio (74.03%), colágena autógena (57.89%) y colágena xenogénica (51.14%) en combinación con ácido glutámico (Glu) y fenilalanina (Phe).¹⁷ En nuestro estudio se obtuvo un porcentaje de tejido neoformado con los andamios de quitosano funcionalizados con el péptido CAP-p15 de 49.8 %.

En un estudio realizado por Biazar et al., 2015 se logró la regeneración ósea casi completa en defectos de calvaria de ratas utilizando un andamio de quitosano, HA y células troncales. Este estudio evidenció resultados muy positivos en el uso de andamios a base de quitosano, reforzando la idea de que este polímero posee propiedades necesarias en la IT que incluyen biocompatibilidad, biodegradabilidad, mucoadhesividad y la capacidad de promover la cicatrización de heridas.^{55,56}

Todos estos resultados indican que los andamios de quitosano funcionalizados con el péptido CAP-p15 son una buena alternativa en la regeneración de tejidos mineralizados.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el andamio de quitosano en combinación con el péptido biofuncional CAP-p15 promovió la regeneración de tejido óseo de un defecto de tamaño crítico en calvaria de rata. Dicho tejido mineralizado fue confirmado como hueso al presentar características histológicas y moleculares como la presencia de los marcadores específicos: BMP-2, BSP, OCN y ALP. Además, los andamios mostraron su completa biodegradación a los 120 días.

Considerando las limitaciones de este trabajo, hacen falta más estudios que permitan una mayor caracterización del tejido neoformado para corroborar que este tejido posee todas las propiedades mecánicas y fisiológicas del tejido óseo; sin embargo, el empleo de un péptido biofuncional combinado con quitosano surge como una alternativa prometedora en la regeneración de tejidos mineralizados.

REFERENCIAS

1. Sepulveda Saavedra, J., & Soto Domínguez, A. (2014). *Texto atlas de histología: biología celular y tisular* (Segunda edición). McGraw-Hill Interamericana.
2. Manzini, B. M., Machado, L. M. R., Noritomi, P. Y., & DA Silva, J. V. L. (2021). Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. *Journal of biosciences*, 46, 17.
3. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*, 2015, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
4. Santiago, I., Condenzo, T. y Morales, A. (2021). Use of mesenchymal stem cells for guided bone regeneration in the dental setting: a review. *KIRU*, 18(3), 187-193.
5. Carranza, F. A., Newman, M. G., Takei, H. H., & Mendez, A. (2014). *Periodontología clínica de Carranza* (Onceava edición). Amolca.
6. Vargas, A., Yáñez, B. & Monteagudo, C. (2022). *Periodontología e Implantología*. (Segunda edición). Editorial Médica Panamericana.
7. Ramírez Ruiz, M. F., & Serrano Bello, J. (2021). *Fabricación y caracterización de andamios porosos de PCL para la regeneración del tejido óseo* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
8. Vázquez Vázquez, F. C., & Álvarez Pérez, M. A. (2020). *Andamios tubulares un nuevo enfoque para la regeneración de tejido óseo* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
9. Suárez Miranda, Z. I., Vargas Ulloa, L. E., & Lupercio Luna, R. I. (2017). *Métodos de obtención de la proteína morfogenética ósea* [Tesina de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
10. Kim, J. M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B., & Shim, J. H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*, 9(9), 2073. <https://doi.org/10.3390/cells9092073>

11. Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry*, 285(33), 25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
12. Kodama, J., & Kaito, T. (2020). Osteoclast Multinucleation: Review of Current Literature. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5685. <https://doi.org/10.3390/ijms21165685>
13. Ross, M. H., Pawlina, W., Alday, A., & Ross, M. H. (2015). *Histología: texto y atlas correlación con biología molecular y celular* (7.^a edición). Wolters Kluwer.
14. Hernández Molina, I. I., & Álvarez García, M. C. (2020). *Actividad y factores de estimulación celular en la regeneración ósea* [Tesina de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
15. Almaguer Flores, A. & Villagómez Olea, J. G. (2018). *Ecología Oral*. Manual Moderno.
16. Si, J., Wang, C., Zhang, D., Wang, B., & Zhou, Y. (2020). Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 26, e919159. <https://doi.org/10.12659/MSM.919159>
17. Scherling Ocampo, A. L., Hoz Rodríguez, L., & Romo Arévalo, E. (2020). *Andamios funcionalizados con aminoácidos como medios inductores de la regeneración ósea* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
18. Komori T. (2008). Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 898–903. <https://doi.org/10.2741/2730>
19. Li, M., Zhang, C., Li, X., Lv, Z., Chen, Y., & Zhao, J. (2019). Isoquercitrin promotes the osteogenic differentiation of osteoblasts and BMSCs via the RUNX2 or BMP pathway. *Connective Tissue Research*, 60(2), 189-199–199. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1080/03008207.2018.1483358>
20. Liu, D. D., Zhang, C. Y., Liu, Y., Li, J., Wang, Y. X., & Zheng, S. G. (2022). RUNX2 Regulates Osteoblast Differentiation via the BMP4 Signaling Pathway. *Journal of Dental Research*, 101(10), 1227-1237.

21. Villaro Gumpert, A. C. (2021). *Histología para estudiantes*. Editorial Médica Panamericana.
22. Carneiro, J., & Junqueira, L. C. U. (2022). *Histología básica: texto y atlas* (13a edición). Editorial Médica Panamericana.
23. Mimila Cortés, A., Montoya, G., & Arzate, H. (2022). *Revisión sistemática de literatura de proteínas y péptidos inhibidores del proceso de mineralización* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
24. Boonrungsiman, S., Gentleman, E., Carzaniga, R., Evans, N. D., McComb, D. W., Porter, A. E., & Stevens, M. M. (2012). The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(35), 14170–14175. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208916109>
25. Romero García, M. J., & Serrano Bello, J. (2021). *Respuesta biológica a andamios impresos en 3D para la regeneración ósea* [Tesina de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
26. Kong, L., Gao, Y., Cao, W., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2005). Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A*, *75*(2), 275–282. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30414>
27. Pires, J. L. D. S., de Carvalho, J. J., Pereira, M. J. D. S., Brum, I. D. S., Nascimento, A. L. R., Dos Santos, P. G. P., Frigo, L., & Fischer, R. G. (2021). Repair of Critical Size Bone Defects Using Synthetic Hydroxyapatite or Xenograft with or without the Bone Marrow Mononuclear Fraction: A Histomorphometric and Immunohistochemical Study in Rat Calvaria. *Materials (Basel, Switzerland)*, *14*(11), 2854. <https://doi.org/10.3390/ma14112854>
28. Lara Martínez, O., & Flores Espinosa, A. (2017). *Regeneración ósea con células madre de terceros molares* [Tesina de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
29. Galicia Becerril, S. D., & Serrano Bello, J. (2019). *Evaluación de la regeneración ósea con andamios de alginato y alginato/hidroxiapatita en calvaria de rata wistar, por medio de imágenes microtomográficas* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.

30. Monteiro, M. & Lombello, C. (2016). Hyaluronic acid and chitosan based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Polímeros*, 26(4).
31. Şimşek, S., Özeç, İ., Kürkçü, M., & Benlidayı, E. (2016). Histomorphometric Evaluation of Bone Formation in Peri-Implant Defects Treated With Different Regeneration Techniques: An Experimental Study in a Rabbit Model. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 74(9), 1757–1764. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2016.05.026>
32. Cisneros Aquino, M. Á., Cruz Aliphath, J. Y., & Castilla Canseco, H. (2021). *Regeneración ósea vs regeneración ósea asistida con plasma rico en plaquetas para regeneración del hueso alveolar* [Trabajo terminal de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
33. Hernández Molina, I. I., & Álvarez García, M. C. (2020). *Actividad y factores de estimulación celular en la regeneración ósea* [Tesina de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
34. Munhoz, M. A. S., Hirata, H. H., Plepis, A. M. G., Martins, V. C. A., & Cunha, M. R. (2018). Use of collagen/chitosan sponges mineralized with hydroxyapatite for the repair of cranial defects in rats. *Injury*, 49(12), 2154–2160. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2018.09.018>
35. Pelegrine, A. A., Aloise, A. C., Zimmermann, A., de Mello E Oliveira, R., & Ferreira, L. M. (2014). Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clinical oral implants research*, 25(5), 567–572. <https://doi.org/10.1111/clr.12117>
36. Mishra, R., Bishop, T., Valerio, I. L., Fisher, J. P., & Dean, D. (2016). The potential impact of bone tissue engineering in the clinic. *Regenerative medicine*, 11(6), 571–587. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0042>
37. Chanes Cuevas, O. A., & Álvarez Pérez, M. A. (2021). *Síntesis y caracterización de un andamio PLA/SBA-15, y su evaluación sobre cultivos 3D en gota colgante para la regeneración ósea* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.

38. Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International journal of biological macromolecules*, 105(Pt 2), 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>
39. Fakhri, E., Eslami, H., Maroufi, P., Pakdel, F., Taghizadeh, S., Ganbarov, K., Yousefi, M., Tanomand, A., Yousefi, B., Mahmoudi, S., & Kafil, H. S. (2020). Chitosan biomaterials application in dentistry. *International journal of biological macromolecules*, 162, 956–974. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.211>
40. Aguilar, A., Zein, N., Harmouch, E., Hafdi, B., Bornert, F., Offner, D., Clauss, F., Fioretti, F., Huck, O., Benkirane-Jessel, N., & Hua, G. (2019). Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(16), 3009. <https://doi.org/10.3390/molecules24163009>
41. Chen, C. K., Chang, N. J., Wu, Y. T., Fu, E., Shen, E. C., Feng, C. W., & Wen, Z. H. (2018). Bone Formation Using Cross-Linked Chitosan Scaffolds in Rat Calvarial Defects. *Implant dentistry*, 27(1), 15–21. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000670>
42. Pang, Y., Qin, A., Lin, X., Yang, L., Wang, Q., Wang, Z., Shan, Z., Li, S., Wang, J., Fan, S., & Hu, Q. (2017). Biodegradable and biocompatible high elastic chitosan scaffold is cell-friendly both in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 8(22), 35583–35591. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14709>
43. Nava Chávez, M. A., & Jarquín Yáñez, K. (2022). *Caracterización de un andamio de gelatina-ácido hialurónico con microesferas de quitosán para regeneración ósea* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
44. Piñón Manuel, M., & Montoya, G. (2022). *Efecto de un fosfopéptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) sobre la formación y crecimiento de cristales de oxalato de calcio* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
45. López Barrios, K., & Montoya, G. (2018). *Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la formación y crecimiento de oxalato de calcio e hidroxiapatita* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.

46. Montoya, G., Arzate, H., & Arenas Alatorre, J. A. (2015). *Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (cap) en un sistema libre de células* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
47. Ureiro Cueto, G. del C., & Montoya, G. (2020). *Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) en la funcionalización de superficies de titanio y óxido de titanio* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.
48. Velásquez, F., Esparza, M., Canseco, J., Villanueva, N., Rincón, H. & Aguado, V. (2017). Bone histomorphometric for modeling and remodeling with toluidine blue on trabecular pediatric tissue. *Patología*, 55(1), 7-17.
49. Kulak, C. A., & Dempster, D. W. (2010). Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 54(2), 87–98. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302010000200002>
50. Martín-Lacave, I. & García-Caballero, T. (2014). *Atlas de Inmunohistoquímica: caracterización de células, tejidos y órganos normales*. Ediciones Díaz de Santos.
51. Shakeel, A. & Saiqa, I. (2016). Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 27-37, <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001>
52. Meimandi-Parizi, A., Oryan, A., Bigham-Sadegh, A., & Sayahi, E. (2018). Effects of chitosan scaffold along with royal jelly or bee venom in regeneration of critical sized radial bone defect in rat. *Iranian journal of veterinary research*, 19(4), 246–254.
53. Martínez-Camacho A. P., Cortez-Rocha M. O., Ezquerro-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodriguez, F., Castillo-Ortega, M. M., Yépiz-Gómez, M. S., & Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.069>
54. Gleeson Lara, D., & Salgado Chavarría, F. (2022). *Efecto de la osteoporosis en la expresión de osteocalcina en ratas Wistar*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM.

55. Biazar, E., Heidari Keshel, S., Tavirani, M. R., & Jahandideh, R. (2015). Bone reconstruction in rat calvarial defects by chitosan/hydroxyapatite nanoparticles scaffold loaded with unrestricted somatic stem cells. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 43(2), 112–116. <https://doi.org/10.3109/21691401.2013.848874>
56. Zhou, D., Qi, C., Chen, Y. X., Zhu, Y. J., Sun, T. W., Chen, F., & Zhang, C. Q. (2017). Comparative study of porous hydroxyapatite/chitosan and whitlockite/chitosan scaffolds for bone regeneration in calvarial defects. *International journal of nanomedicine*, 12, 2673–2687. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131251>