



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE HUESO  
BOVINO DESMINERALIZADO PARA AUMENTO DE  
REBORDE ALVEOLAR.

**T E S I N A**

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:

ALFONSO JAVIER URIBE VALLARTA

TUTORA: Dra. KATIA JARQUÍN YÁÑEZ



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.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la Máxima Casa de Estudios y ayudarme en mi formación profesional, personal y cultural.

A la Facultad de Odontología de la UNAM por brindarme todos los recursos para mi formación profesional.

A mis padres por siempre estar presentes en cada etapa de mi vida, por su dedicación, apoyo incondicional y brindarme todo cada día. Por ser mi ejemplo y mi motivación. Gracias por la formación que me han dado y la ayuda para crecer como persona, hijo y hermano.

A mis hermanos porque me han enseñado tantas cosas y ayudado a formarme sin olvidar lo que verdaderamente es importante. Sigamos creciendo juntos.

A la Dra. Katia Jarquín Yáñez por su orientación, dedicación y tiempo brindados a lo largo de la realización de esta tesina.

Al laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de tejidos de la Facultad de Medicina de la UNAM por todo su apoyo y orientación en esta investigación, en especial al Dr. Andrés E. Castell Rodríguez, a la Dra. Gabriela Piñón Zárate y a la Dra. Dulce María González García. Al proyecto **PAPIIT-IN221419**, por ser el motor de investigación científica en este trabajo. Por su apoyo técnico a: Iván Daniel Ávila Campos, Montserrat Aline Rosas Alvarado y al M.C. Carlos Aarón Méndez Celis.

A la Mtra. María Luisa Cervantes Espinosa por su dedicación y vocación como docente de la Facultad de Odontología UNAM y coordinadora del Seminario de Titulación de Prótesis.

A todos mis profesores que a lo largo de estos cinco años estuvieron presentes.

A mis amigos por su amistad y apoyo a lo largo de estos años.

Por mi raza hablará el espíritu.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
<b>III. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DE REGENERACIÓN ÓSEA ..</b>	<b>7</b>
3.1.1 Células óseas.....	8
3.1.2 Composición de la matriz ósea .....	9
3.1.3 Fisiología del tejido óseo .....	10
<b>3.2 EL HUESO ALVEOLAR.....</b>	<b>13</b>
3.2.1 Desarrollo embrionario del maxilar y mandíbula .....	13
3.2.2 Formación del hueso alveolar .....	16
3.2.3 Cicatrización alveolar .....	20
<b>3.3 BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS .....</b>	<b>22</b>
3.3.1 Procesos de descelularización.....	23
3.3.2 Mecanismos para evaluar la proliferación y citotoxicidad celular .....	24
3.3.3 Presto Blue.....	25
3.3.4 Biocompatibilidad.....	26
3.3.5 Mecanismos biológicos de integración en injertos óseos y clasificación .....	26
<b>3.4 AUMENTO DEL REBORDE ALVEOLAR CON TEJIDO         DURO .....</b>	<b>29</b>
3.4.1 Regeneración ósea guiada.....	29
3.4.2 Injertos óseos en bloque.....	30
3.4.3 División/ expansión del reborde .....	31
3.4.4 Aumento vertical del reborde .....	32
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>33</b>
<b>V. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>VI. HIPÓTESIS .....</b>	<b>34</b>

<b>VII. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>7.1 Objetivo general.....</b>	<b>34</b>
<b>7.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>VIII. METODOLOGÍA.....</b>	<b>35</b>
<b>IX. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>X. DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>XI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>

## I. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes retos que enfrenta la Odontología actual es la cantidad y calidad disminuida del reborde alveolar remanente en pacientes que han sufrido atrofia de los maxilares debido a pérdida de piezas dentales, tenido algún traumatismo o padecido de enfermedad periodontal. Esto complica cualquier rehabilitación y disminuye las opciones de tratamiento, además de constituir un problema de salud bucal. En el caso de la Implantología, un adecuado volumen del reborde alveolar servirá como predecesor de una oseointegración adecuada.

Los injertos son fundamentales en tratamientos de reparación y regeneración del tejido óseo. Además, algunos biomateriales han sido creados para la regeneración ósea como material de relleno. Se han desarrollado tratamientos y diversas técnicas odontológicas combinadas con sustitutos biológicos de parte de la ingeniería de tejidos para preservar, recuperar y mantener la función de las estructuras. Debido a esto, en cuanto a un injerto óseo, se han clasificado tres tipos. Los autoinjertos (hueso del mismo paciente), aloinjertos (proveniente de otra persona), xenoinjertos (hueso proveniente de un animal) o los aloplásticos (materiales sintéticos, biocerámicos o cristales activos). Cada uno con sus indicaciones, ventajas y desventajas. No obstante, la utilización de xenoinjertos ha ido a la alza como el tratamiento más viable para la colocación de un injerto óseo en tratamientos odontológicos que necesiten una regeneración del reborde alveolar.

Sin embargo se han tenido que realizar años de investigación para crear biomateriales que no presenten dificultad de aceptación que pueda provocar una respuesta inmune indeseada. Los xenoinjertos de origen bovino han sido los osteoconductores más utilizados al funcionar como andamios para la proliferación de las células óseas y su consiguiente regeneración alveolar. En la siguiente tesina se evaluará la biocompatibilidad de hueso bovino utilizado como andamio para el cultivo de células mesenquimales de cordón umbilical.

## II. ANTECEDENTES

En el transcurso de los años se han descrito varios procedimientos clínicos y quirúrgicos en la Odontología cuyo principal objetivo es la devolución de la función, fines estéticos o el englobamiento de varios factores que mejoren la calidad de vida de los pacientes. En la actualidad uno de los problemas más estudiados en la Odontología es la pérdida del hueso alveolar la cual compromete los tratamientos actuales como el caso de prótesis implantosoportadas.

El primer indicio registrado del empleo de injertos óseos para la reconstrucción de defectos óseos data de 1668, con el trasplante de hueso heterólogo proveniente de un perro al receptor que era un humano con un defecto craneal. Esto fue realizado por Van Meekren.

En 1809, Merrem, realizó el primer trasplante de injerto autógeno óseo. Por otra parte Macewen en el año de 1878, trasplantó un hueso alogénico en humanos y Bardenheur, ya en 1891 realizó el primer injerto de hueso autógeno a la mandíbula.

A principios del siglo XX, Payr, describió el uso de trasplantes libres de tibia y costilla. Años más tarde a finales de la década de los 30's, Orell produjo un material de injerto de hueso bovino, y pocos años después en 1942, Wilson creó un banco de huesos usando técnicas de congelación.

En el año de 1990 Seibert y Nyman, en un experimento en perros cuyo reborde alveolar estaba desdentado, lograron la neoformación de hueso en atrofas de las paredes en sentido vestibulolingual con la utilización de membranas no reabsorbibles. Lo cual dio paso a la técnica de Regeneración Tisular Guiada.<sup>1,2</sup>

### **III. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DE REGENERACIÓN ÓSEA**

El tejido óseo, está descrito histológicamente como un tejido conectivo especializado que se caracteriza por su dureza y consistencia rígida debido a los minerales que conforman su estructura. Dicho tejido forma parte del aparato locomotor. Constituye en sí, el esqueleto, que junto con otros tejidos permiten al ser humano adquirir diversas posturas y movimientos; a su vez cumple la función de proteger y alojar a órganos y tejidos vitales (corazón, cerebro, médula espinal, médula ósea o hematopoyética).<sup>3,4</sup>

De acuerdo a la disposición de las laminillas de matriz osteoide calcificada, se ha clasificado al hueso como cortical o compacto, y trabecular o esponjoso. La estructura secundaria del hueso está formada por una yuxtaposición de estructuras cilíndricas llamadas osteonas, ricamente vascularizadas e inervadas. Su forma estructural difiere en el hueso cortical y en el hueso trabecular. El hueso cortical está constituido por la yuxtaposición de osteonas que presentan en el centro un canal de Havers y canales de Volkmann que aseguran comunicaciones transversales entre las osteonas, con disposición concéntrica de sus laminillas en cuyo interior encontramos a los osteocitos. El hueso esponjoso presenta una disposición en forma de red en cuyo interior se encuentra médula ósea.<sup>5,6</sup>

El tejido óseo posee capacidades únicas de regeneración mediante procesos de resorción y osteogénesis. Las células especializadas osteoprogenitoras, los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos son los encargados de estos procesos y forman junto con una matriz, al tejido óseo.



### 3.1.1 Células óseas

#### Células osteoprogenitoras

Se encuentran en la capa celular interna del periostio; revisten los canales de Havers y las cavidades medulares <sup>4,5</sup>

#### Osteoblastos

Los osteoblastos sintetizan proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica o sustancia osteoide, así como las moléculas de señalización. Conforme fabrican la sustancia osteoide emiten delgadas proyecciones, creando uniones gap entre ellos, dirigiendo la disposición de las fibras de la matriz extracelular. Al quedar atrapados en la matriz orgánica se diferencian en osteocitos y el espacio que ocupan en dicha matriz se denomina laguna ósea. Además de sintetizar matriz ósea y diferenciarse en osteocitos, los osteoblastos intervienen en la mineralización/calcificación de la matriz gracias a la fosfatasa alcalina. Al terminar la formación del hueso, su superficie externa conserva una capa de osteoblastos inactivos que han dejado de sintetizar matriz y presentan una morfología aplanada (células de revestimiento de hueso) los cuales van a mediar la reabsorción mediante citocinas específicas.<sup>5</sup>

#### Osteocitos

Son las células más abundantes en el hueso y las únicas que se encuentran en el interior. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción. La función de los osteocitos es mantener el intercambio de sustancias nutritivas entre los vasos sanguíneos del tejido óseo y la matriz ósea y depositar o extraer pequeñas cantidades de sales de calcio cuando el metabolismo del hueso así lo requiere. Su actividad está coordinada por la hormona tiroidea calcitonina y la hormona paratiroidea paratohormona.<sup>5</sup>

## Osteoclasto

Se originan a partir de células madre hematopoyéticas medulares denominadas Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM), y son las células encargadas de la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después, mediante la secreción de ácidos generados por la anhidrasa carbónica y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa.<sup>3</sup>

Los osteoclastos se encuentran en las denominadas lagunas de Howship que son excavaciones superficiales en los bordes del tejido óseo en remodelación, y éstas señalan las zonas de reabsorción del hueso.<sup>3,5</sup>

### 3.1.2 Composición de la matriz ósea

El osteoblasto es la célula ósea responsable de la producción de la matriz ósea y de su mineralización. La matriz ósea está integrada por matriz orgánica e inorgánica. La porción orgánica que conforma el osteoide, está constituida a su vez, por matriz amorfa y matriz fibrilar; la matriz amorfa está conformada por glucosaminoglucanos, proteoglucanos, glucoproteínas y moléculas de adhesión como la osteonectina, la osteocalcina y la osteopontina. Constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo. La matriz fibrilar está constituida por fibras de colágeno I (90%). Por otro lado, la matriz inorgánica que constituye dos terceras partes del peso óseo, está formada por los minerales que se

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_3$  )<sub>2</sub>, y en menor proporción hay magnesio, sodio, manganeso, potasio, y flúor.<sup>3,5-7</sup>

### 3.1.3 Fisiología del tejido óseo

El proceso de mineralización del tejido óseo es posible gracias a una matriz extracelular adecuada, una concentración baja de inhibidores de la mineralización y una elevada concentración local de calcio y fosfatos. Al igual que proteínas que permiten la mineralización ósea e inhibidores. En la red tridimensional de las fibras de colágeno de tipo I, se crean núcleos donde se forman cristales de hidroxiapatita de calcio ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) gracias a una concentración de calcio y fosfato apropiada.<sup>6</sup>

Este proceso de mineralización requiere de enzimas, entre ellas encontramos a la fosfatasa alcalina. Es una enzima presente en la superficie de los osteoblastos diferenciados; escinde los enlaces fosfatos para liberar el fosfato inorgánico (Pi) necesario para el proceso de mineralización.

La vascularización cortical utiliza los canales de Havers y los canales de Volkmann, para lograr que cada sector óseo, epifisario, metafisario y diafisario, estén vascularizados.

El tejido óseo está ricamente innervado en las zonas con alto poder osteogénico, como el periostio, las metáfisis y las epífisis. Las fibras nerviosas sensitivas y autónomas del sistema simpático están en contacto con las células óseas.<sup>6</sup>

El tejido óseo está bajo constante remodelación debido a regulación del metabolismo fosfocálcico y a la adaptación a las presiones mecánicas cuya orientación y dimensión trabecular depende de las fuerzas aplicadas al esqueleto (ley de Wolff), así como a los requerimientos hormonales, llevada a cabo por los osteoclastos que son las células encargadas de la reabsorción del tejido viejo, y por los osteoblastos, que sintetizan el tejido nuevo. En la remodelación ósea la reabsorción y formación ósea están estrechamente acopladas en zonas delimitadas que son llamadas *unidades multicelulares básicas* (BMUs). Comprende una fase de

reabsorción ósea que dura alrededor de tres semanas y una fase de formación ósea que dura alrededor de 3-4 meses.<sup>6,8</sup>

La primera etapa de la remodelación se inicia con la retracción de las células bordeantes, la presencia de microfracturas reconocidas por los osteocitos, y por un estímulo hormonal en la superficie ósea. Los osteoblastos secretan una proteína (RANK ligando) que atrae a la superficie ósea y activa los preosteoclastos para llevar a cabo su diferenciación y maduración para así ser capaces de reabsorber el tejido óseo y comenzar la remodelación. Esta fase es conocida como activación.<sup>6-8</sup>

Los osteoclastos se adhieren a la superficie del hueso mediante moléculas de adhesión, desarrollando proyecciones de la membrana plasmática y formando las lagunas de Howship en la fase llamada de inversión.

El hueso es reabsorbido en dos fases, la primera consiste en solubilizar el material acidificando la matriz ósea utilizando iones  $H^+$ , y la segunda fase consiste en la degradación del colágeno por medio de metaloproteinasas y catrepsinas secretadas por el osteoclasto.<sup>6,7</sup>

Cuando se ha completado el proceso de reabsorción los osteoclastos mueren por apoptosis y su lugar es ocupado por los osteoblastos que bajo estímulo de factores de crecimiento, se reclutan en las áreas de remodelación y comienzan a sintetizar tejido osteoide que después se mineraliza; conocida como fase de formación. El proceso de mineralización comienza alrededor de los once días y termina en un lapso de tres a cuatro meses y así concluye el proceso de remodelación ósea. Los osteoblastos involucrados en la remodelación del hueso nuevo, son incorporados en la matriz ósea y se diferencian en osteocitos. Otros osteoblastos quedan sobre la superficie ósea como células de revestimiento (superficies en reposo), y otra parte de ellos mueren por apoptosis.

El hueso trabecular se renueva de cinco a ocho veces más rápido que el hueso cortical. La última fase, llamada de quiescencia, consiste en una mineralización secundaria, es decir, una acumulación de hidroxapatita en la matriz, en ausencia de osteoblastos. Este grado de mineralización influye en el grado de resistencia mecánica del tejido óseo (figura 1).<sup>4,6</sup>

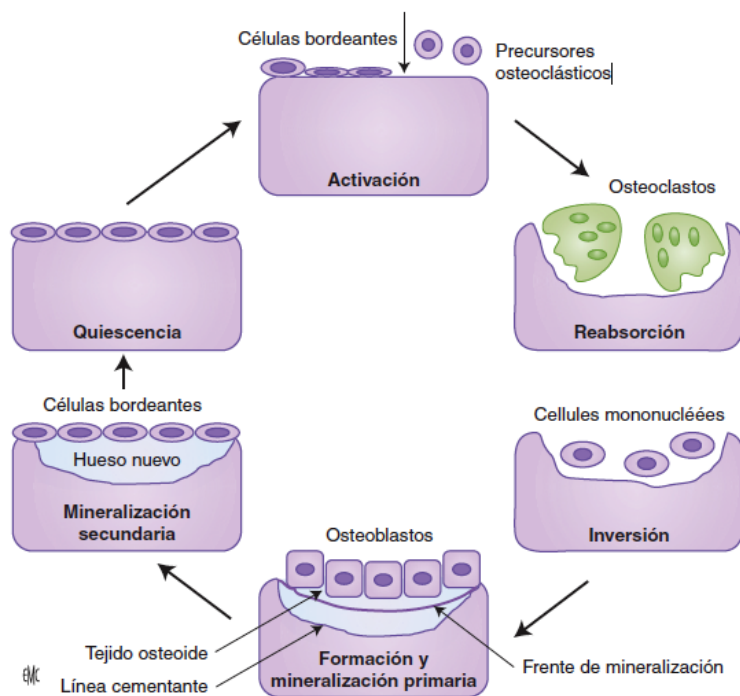


Figura 1 Esquema representativo de las etapas de remodelación ósea.

## **3.2 EL HUESO ALVEOLAR**

El hueso alveolar forma parte de los tejidos duros periodontales. Cuenta con numerosos nichos donde se alojan los dientes y están sujetos por medio del ligamento periodontal y el cemento encontrado en las raíces de los mismos, alberga ambas denticiones, funcionando como un dispersor de las fuerzas de masticación.

Está sometido a un proceso constante de remodelación ósea pero existen diversas causas por las que se va perdiendo en sentidos ya sean verticales, horizontales o bien mixtos. Dichas causas involucran la pérdida dental, traumatismos, enfermedad periodontal o bien, la misma edad.

### **3.2.1 Desarrollo embrionario del maxilar y mandíbula**

La formación del maxilar y la mandíbula involucra la histogénesis, así como el proceso de osificación del hueso; dos procesos que ocurren simultáneamente. Ambas estructuras son provenientes del primer arco branquial. La histogénesis se origina a partir de células osteoprogenitoras derivadas de células mesenquimáticas que se transforman en osteoblastos que van a comenzar a sintetizar la matriz ósea, la que después será mineralizada, al ser estimuladas por proteínas como la proteína morfogenética ósea (BMP). La formación de los maxilares comprenderá desde la séptima semana hasta su conformación total cerca de la semana trece durante el periodo embrionario. Alrededor de los siete meses, durante el periodo fetal, comienzan los procesos de remodelación ósea.

El crecimiento postnatal, se da de forma acelerada a consecuencia de la lactancia y masticación que comienza entre los doce y dieciocho meses de edad.<sup>9</sup>

Existen dos tipos de osificación:

a) Intramembranosa

Se caracteriza por poseer abundantes capilares, fibras de colágeno y osteoblastos en sus centros de osificación. El osteoide se dispone en trabéculas que constituyen una red tridimensional en cuyos espacios intratrabeculares, el mesénquima se transforma en médula ósea y el tejido mesenquimatoso externo se diferencia en periostio. En las zonas periféricas, el tejido óseo se dispone formando las tablas externa e interna y en su zona media es de variedad esponjosa. Esta osificación corresponde a la del maxilar.<sup>9</sup>

b) Endocondral

Su osificación se caracteriza por presentar un molde de cartílago hialino el cual presentará cambios histológicos que comprenden la proliferación e hipertrofia celular, una calcificación de la matriz cartilaginosa, invasión vascular aunada a una erosión del cartílago, seguida de formación de tejido osteoide y posterior mineralización. Este tipo de osificación la presenta la rama de la mandíbula.

Gómez de Ferraris menciona que la osificación está estrechamente relacionada con la función del hueso. En un hueso cuya osificación fue intramembranosa, se caracterizará por estar expuesto a tensiones y crecerá por aposición. Sin embargo si va a estar expuesto a presiones constantes, el desarrollo será endocondral ya que el cartílago al ser rígido y flexible, soportará mejor las cargas y su crecimiento será de tipo aposicional e intersticial.

#### Osificación del maxilar

A principios de la séptima semana comienza la osificación intramembranosa del maxilar a partir de dos centros de osificación

ubicados fuera del cartílago nasal que se encargarán de la formación de la parte ósea externa del maxilar. A partir del centro de osificación premaxilar se forman trabéculas orientadas en tres direcciones. La primera hacia arriba para formar la parte anterior de la apófisis ascendente, hacia delante en dirección a la espina nasal anterior y en dirección a las apófisis alveolares incisivas encargadas del desarrollo de los incisivos.<sup>9</sup>

El centro postmaxilar tiene cuatro direcciones de crecimiento, en dirección posterior, hacia el piso de la órbita, hacia la apófisis malar y hacia la porción alveolar posterior donde se desarrollan los caninos y dientes posteriores.

La osificación interna se inicia posteriormente con el avance de las trabéculas por dentro de las crestas palatinas hasta la fusión de los procesos palatinos laterales alrededor de la doceava semana para dar origen al paladar duro.

El crecimiento del maxilar es por dominancia de las suturas intraóseas (sutura maxilomalar, frontomaxilar, cigomática temporal, mediopalatina), el desarrollo de las apófisis alveolares y por el desarrollo de las cavidades neumáticas (senos maxilares y frontales).<sup>9</sup>

#### Osificación mandibular

Tiene un mecanismo de osificación yuxtaparacondral en el cartílago de Meckel que comienza alrededor de la séptima semana en el ángulo formado por las ramas del nervio mentoniano al separarse del dentario inferior, lugar donde comienza la aposición de las trabéculas en dirección anterior y posterior paralelas al cartílago de Meckel.<sup>9-12</sup>

Existen dos tipos de osificación en la mandíbula, una osificación intramembranosa en la porción ventral del cartílago que dará lugar al cuerpo mandibular, y una osificación endocondral que comienza en la



semana doce donde aparecen tres centros de cartílago independientes que formarán la rama ascendente y serán puntos de inserción de los músculos masticadores.

### **3.2.2 Formación del hueso alveolar**

Al finalizar la octava semana del periodo embrionario, los gérmenes dentarios tanto en el maxilar como en la mandíbula, estimulan la formación del hueso alveolar alrededor de los mismos gérmenes. Los alveolos van creciendo y desarrollándose a medida que pasan de la etapa preeruptiva a la eruptiva prefuncional.<sup>9,10,13</sup>

Con la formación radicular se conforman los tabiques óseos y de esta forma se incorpora el hueso alveolar a los procesos maxilares hasta unirse a la porción basal. La remodelación está íntimamente relacionada con el crecimiento de los huesos y con las funciones de los tejidos blandos que lo rodean. Sin embargo el hueso alveolar se reabsorbe gradualmente cuando los dientes se pierden, resultado de un proceso de cicatrización que afecta componentes estructurales, funcionales y fisiológicos.<sup>9-11,13,14</sup>

El hueso alveolar forma parte de los tejidos periodontales y es donde están alojados los dientes. Radiográficamente es un hueso compacto donde se observa delimitando cada alveolo una zona radiopaca denominada lámina dura. Presenta múltiples porosidades por donde pasan vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas hacia el ligamento periodontal además de ser la inserción de las fibras de Sharpey.<sup>13</sup> Figura 2



Figura 2 Representación radiográfica del hueso alveolar.<sup>15</sup>

El proceso alveolar consta de tablas corticales externas de hueso compacto, hueso esponjoso en la porción central y el hueso alveolar que limita a los alveolos dentarios. La alineación de los dientes, las fuerzas de masticación y la posición de la raíz en el alveolo determinan la altura y espesor de las tablas, siendo en la zona anterior del maxilar la región con tablas más delgadas y la región posterior de la mandíbula con las tablas más gruesas.

Su contorno es festoneado debido a la prominencia de las raíces y presenta depresiones verticales intermedias que convergen hacia el borde coronario.

La remodelación del hueso alveolar es de tipo asincrónica, hay reabsorción en una superficie de la pared del alveolo mientras se equilibra por la formación ósea en la superficie opuesta.<sup>13</sup>

La pérdida dentaria produce cambios dimensionales ocasionando frecuentemente defectos en el reborde alveolar. La prevención y el tratamiento de dichos defectos, tiene como objetivo la preservación o el aumento del reborde para una futura restauración protésica.<sup>10,12,13,16-20</sup>

Existen varias clasificaciones

- Desde el punto de vista morfológico se pueden clasificar la pérdida dimensional del reborde por defectos horizontales y verticales, utilizando la clasificación de Seibert (1983)
  - Clase I. Pérdida de la dimensión vestibulolingual, con altura coronoapical normal de la cresta.
  - Clase II. Pérdida dimensional en sentido vertical siendo el espesor vestibulolingual normal.
  - Clase III. Combinación de pérdida tanto vertical como horizontal del proceso alveolar.
  
- Allen (1985) creó una clasificación para la severidad del defecto.
  - Leve cuando es menor a 3 mm.
  - Moderada cuando comprende de 3-6 mm.
  - Severa cuando es mayor a 6 mm.
  
- Clasificación de Cawood y Howell (1988) de las atrofiás maxilares post extracción, donde analizaron la fisiopatología de reabsorción alveolar.
  - Clase I. Dentado.
  - Clase II. Postextracción.
  - Clase III. Reborde redondeado, adecuadas altura y anchura.
  - Clase IV. Reborde afilado, adecuada altura, inadecuada anchura.
  - Clase V. Reborde plano, altura y anchura inadecuadas.
  - Clase VI. Reborde deprimido con grandes variables de pérdida de hueso basal que puede ser amplia pero predecible.<sup>21-23</sup> Figura 3

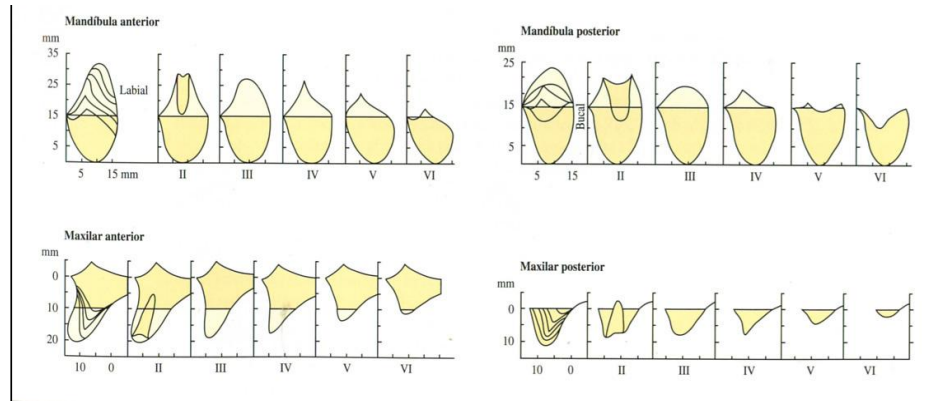


Figura 3 Se ejemplifica la reabsorción alveolar del maxilar y mandíbula en sus seis clases según la clasificación de Cawood y Howell.<sup>24</sup>

- Clasificación de Misch (1988) donde se propuso cuatro tipos de densidades óseas independientemente de la región de los maxilares. Se basa en las características macroscópicas del hueso.
  - D1. Hueso cortical denso
  - D2. Hueso de buena calidad con cortical densa o porosa y con presencia de hueso trabecular grueso.
  - D3. Presenta la cresta cortical porosa y delgada. El hueso trabecular es fino.
  - D4. No hay presencia o es mínima de hueso cortical.
  
- Lekholm y Zarb en 1985 crearon una clasificación donde describen cuatro calidades óseas encontradas en los maxilares.
  - Calidad 1. Constituída por hueso compacto homogéneo.
  - Calidad 2. Presenta una gruesa capa cortical rodeando al hueso trabecular denso.
  - Calidad 3. Presenta una capa fina de hueso cortical rodeando al hueso trabecular de resistencia favorable.
  - Calidad 4. Capa fina de hueso cortical rodeando un núcleo de hueso trabecular de baja densidad.

- Hämerle y Jung en 2008 crearon una clasificación de los efectos del alveolo postextracción la cual sirve en casos de colocación de implantes inmediatos.
  - Clase I. Alveolos con paredes intactas después de la extracción dentaria.
  - Clase II. Alveolos que tienen dehiscencia o fenestración marginal en la pared vestibular después de la extracción dentaria.
  - Clase III. Alveolos que presentan dehiscencias grandes en la pared vestibular después de la extracción dentaria.<sup>10,12,22</sup>

### **3.2.3 Cicatrización alveolar**

La capacidad autorregeneradora del hueso se ha conocido desde hace ya cientos de años; esta capacidad ha sido constantemente limitada debido a la extensión de las lesiones óseas y el tamaño del defecto. Algunos autores como Sanz Casado, Martínez Corría y López Lacomba mencionan tres fases de cicatrización del hueso.

- a. Formación del coágulo  
Ocurre inmediatamente tras la extracción dental acompañada de un proceso de inflamación.
- b. Proliferación y diferenciación celular  
Alrededor del tercer día comienza la formación de un tejido de granulación (callo óseo) compuesto por fibroblastos, macrófagos, colágeno y nuevos vasos sanguíneos, los cuales van a aportar nutrientes y células indiferenciadas que mediante factores morfodiferenciadores, se van a diferenciar en osteoblastos.
- c. Remodelación ósea  
El hueso desorganizado se convierte en una estructura lamelar madura.

Se pueden observar dentro de estas tres etapas procesos de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, los cuales conllevan al éxito en la regeneración ósea. Sin embargo, se ha vuelto un asunto de práctica diaria el empleo de injertos para la reparación de las lesiones óseas siendo como condición que posea una de las cualidades a los procesos señalados anteriormente.<sup>25,26</sup>

### 3.3 BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS

Uno de los principales problemas de salud bucodental en la actualidad es la pérdida del proceso alveolar remanente, cuya estructura original ha sido afectada debido a pérdida prematura de piezas dentales, traumatismos, patologías o la presencia de enfermedad periodontal. Esto se ha convertido en un gran reto para el odontólogo en la actualidad, por lo que interdisciplinariamente realiza nuevos procedimientos utilizando materiales biocompatibles que si bien, no reemplazan la estructura perdida, ayudan a disminuir el tamaño de los defectos. Nuevas terapias que implican la regeneración o reemplazo de tejidos u órganos a través de constructos tridimensionales tisulares, que devuelvan la forma y función, a partir de las propias células del paciente, en conjunto con biomateriales y biomoléculas.

La ingeniería de tejidos ha ayudado en la creación de nuevas terapias que implican la regeneración o reemplazo de tejidos a través biomateriales y biomoléculas. Esta rama médica comenzó a finales de 1987 y se ha dedicado a la construcción de tejidos para su uso en medicina basándose principalmente en tres componentes fundamentales: *células troncales* como por ejemplo las obtenidas de células de cordón umbilical, capaces de dar origen a linajes celulares ya diferenciados; *andamios* de origen natural o sintético, como por ejemplo matrices extracelulares de bovino que han pasado por procesos de descelularización a los cuales se les ha evaluado la proliferación celular así como su citotoxicidad y finalmente las *biomoléculas* que son los factores de crecimiento.<sup>27</sup>

En Odontología, los defectos óseos son afecciones que oscilan desde recesiones que miden milímetros y no representan algún defecto limitante, hasta pérdidas óseas que comprometen la estructura, función y estética como lo es una resección completa de la mandíbula. Dichos defectos óseos han sido tratados con terapias regenerativas de vanguardia empleando hueso liofilizado, membranas o prótesis metálicas, que en la mayoría de los casos devuelven la función de manera limitada.<sup>27</sup>

### 3.3.1 Procesos de descelularización

Existen diversos métodos de descelularización que se pueden combinar para lograr una mayor remoción del contenido celular, los cuales, a su vez, buscan disminuir el daño a la matriz y conservar sus propiedades mecánicas y biológicas. Entre los más comunes se encuentran los siguientes:

- a. Métodos físicos: congelación, presión, ultrasonido y agitación. Utilizados para lisar las células.
- b. Tratamientos ácidos y alcalinos: ácido peracético, desoxicólico y acético. Bases como el hidróxido de amonio, sulfuro de sodio, hidróxido de sodio e hidróxido de calcio. Su función es solubilizar el contenido citoplasmático y remover los ácidos nucleicos.
- c. Detergentes no iónicos: en este grupo se destaca el Tritón X-100. Estos detergentes rompen las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína, sin producir efectos graves en la estructura del tejido.
- d. Detergentes iónicos: tienden a desnaturalizar las proteínas al romper las interacciones proteína-proteína y solubilizan tanto las membranas citoplasmáticas como las nucleares.
- e. Solventes orgánicos: disminuye el colágeno en la matriz y remueve el contenido nuclear en algunos tejidos. El más utilizado es el tri(n- butil) fosfato.
- f. Tratamientos hipotónicos e hipertónicos: producen lisis celular por medio de choques osmóticos, pero no remueven los remanentes.

Soluciones hipotónicas como el tris buffer 10 mM o el ácido



etilendiamino-tetraacético (EDTA) 5 mM.

Soluciones hipertónicas como la solución salina 3 M, la sacarosa 1 M, el cloruro de potasio 0,6 M o el yoduro de potasio 1 M.

- g. Métodos enzimáticos: incluyen la digestión con proteasas y nucleasas. La exposición prolongada a estos agentes puede causar daños en los componentes de la matriz extracelular.<sup>28,29</sup>

### **3.3.2 Mecanismos para evaluar la proliferación y citotoxicidad celular**

El NIH (Instituto Nacional del Cáncer por sus siglas en inglés), define a la proliferación celular como el aumento del número de células siendo resultado del crecimiento y la multiplicación celular.<sup>30</sup>

Para evaluar la proliferación *in vitro* de células, se utilizaban sustancias radioactivas como la timidina tritiada. Sin embargo, se han estandarizado técnicas inmunocitoquímicas no radioactivas que son fáciles de manejar, más rápidas y seguras como el caso de la bromodeoxiuridina (BrdU), que es reflejada cuando las células entran en fase S del ciclo celular.

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Se puede supervisar mediante ensayos que miden los cambios en la viabilidad, la proliferación, la función de las mitocondrias, la fosfolipidosis/esteatosis, los daños en el ADN y el ciclo celular.

Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la

proliferación celular y la citotoxicidad debe ser simple, eficiente, rápida, reproducible, sensible, efectiva y segura. Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*:

- a. El uso de colorantes tales como cristal violeta y sulforodamina B, que por su afinidad con los aminoácidos básicos de las proteínas, colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado.
- b. Los detectores de liberación de componentes constitutivos celulares, que miden la actividad de enzimas tales como lactato deshidrogenasa.
- c. Aquellos que miden la función metabólica de las células usando las sales de tetrazolio; requiere de células vivas, o que, al menos, muestren actividad óxido-reductasa, los cuales al ser reducidos a formazán producen una intensa coloración. Método que emplea la reducción metabólica de MTT; este método fue desarrollado por Mosmann en el año de 1983 como método colorimétrico cuantitativo de microtitulación para la determinación de la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas.<sup>29,31</sup>

### **3.3.3 Presto Blue**

El reactivo de viabilidad celular PrestoBlue®, es una solución basada en resazurina (colorante fluorescente azul) lista para su uso que penetra en las células y funciona como un indicador de viabilidad celular mediante la reducción de las células vivas para medir cuantitativamente la proliferación de las mismas. Es un reactivo sólo de adición con especificaciones colorimétricas y fluorescentes para uso en espectrofotómetro. Su tiempo de incubación va de 10 minutos a 2 horas. Se utiliza como un indicador de oxidación-reducción en los ensayos de viabilidad celular para la respiración tanto aeróbica como anaeróbica. El

tiempo de manipulación se minimiza al usar este reactivo ya que no requiere lisis celular o solubilización como requieren otros ensayos de proliferación celular.<sup>32</sup>

### **3.3.4 Biocompatibilidad**

Williams define a la biocompatibilidad como el estado de equilibrio cuando un biomaterial se introduce en un medio fisiológico, sin que el material reaccione y afecte significativamente al organismo, o que el medio orgánico reaccione y afecte al biomaterial.<sup>20</sup>

### **3.3.5 Mecanismos biológicos de integración en injertos óseos y clasificación**

Dentro de los biomateriales utilizados para regeneración ósea se describen los de relleno o injerto (productos biológicos que rellenan los defectos óseos) y los materiales de aislamiento o barrera (son biomateriales naturales o sintéticos que actuando como barrera evitan que ciertos tipos celulares invadan un espacio concreto permitiendo así la proliferación de grupos celulares específicos).<sup>10,33</sup>

Los injertos se clasifican según su función y origen. Nielsen y cols. mencionan que los materiales para injertar en defectos óseos periodontales se pueden considerar de tres tipos de acuerdo a su función.

- Osteogénicos, que se caracterizan por la presencia de células formadoras de hueso contenidas dentro del injerto.
- Osteoconductores, siendo la función del material a injertar el servir como andamio para la proliferación de las células óseas del hueso adyacente.
- Osteoinductores, donde por medio de un proceso químico de las moléculas contenidas en el injerto (e.g. proteínas morfogenéticas

óseas), transforman células vecinas en osteoblastos para la síntesis de hueso.<sup>10,12,33</sup>

La categorización por origen es la siguiente:

- Autoinjertos. Proviene del mismo individuo. Se obtiene el injerto de sitios extraorales como la cresta iliaca, o de sitios intraorales como la sínfisis mentoniana. Es una técnica que no se utiliza recurrentemente ya que es considerada invasiva y se requiere de dos intervenciones quirúrgicas.
- Aloinjertos. Proviene de otro individuo de la misma especie con diferente genética.
- Xenoinjertos. Provenientes de otra especie donadora. Su función es osteoconductiva ya que el injerto sufre una desmineralización y descelularización dejando únicamente su arquitectura trabecular y porosidad; su única función es servir como andamio.<sup>10,12,33</sup>

Algunos autores llegan a considerar una cuarta alternativa de injerto de acuerdo a su origen. Son denominados materiales aloplásticos, cuyo origen es sintético o inorgánico y son utilizados como material de relleno en los defectos óseos sin llevar a cabo alguna función anteriormente descrita. Contienen diferentes combinaciones de fosfatos de calcio que le confieren diversas propiedades físicas y tasas de resorción.<sup>10</sup>

Según la indicación clínica es la selección del origen del injerto. Cuando hay defectos óseos pequeños que requieren aumento horizontal, el uso de xenoinjertos e injertos aloplásticos son los más indicados en combinación con una membrana según los principios de regeneración ósea guiada (ROG). Si se requiere preservar las paredes alveolares posextracción, el injerto indicado es el xenoinjerto por su demostración de resorción menor mediante vistas histológicas donde se demuestra una mejor integración del injerto quedando rodeadas sus partículas por hueso neoformado. Se ha demostrado que la utilización de injertos autólogos en

alveolos postextracción no contrarresta el proceso fisiológico de la cicatrización y remodelación alveolar, presentando características similares a alveolos sin relleno alguno.

En defectos grandes cuyo objetivo es el aumento tanto horizontal como vertical, se indica el uso de injertos en bloque corticoesponjosos autógenos monocorticales, donde se debe utilizar una membrana reabsorbible ya que Von Arx y cols en 2001 demostraron una resorción vestibulocrestal significativa y aumentación ósea limitada en injertos de bloque sin la colocación de membrana.<sup>12,13</sup>

### **3.4 AUMENTO DEL REBORDE ALVEOLAR CON TEJIDO DURO**

En especialidades de la Odontología como lo es la Prótesis Dental e Implantología, Periodoncia y Ortodoncia, un adecuado volumen óseo es uno de los factores críticos para conseguir un buen pronóstico en los tratamientos actuales. En situaciones con un inadecuado volumen de hueso, las técnicas de aumento del reborde alveolar son recurridas con frecuencia para un tratamiento. Los injertos son fundamentales para reparar y regenerar el tejido óseo. Está indicado un injerto de tejido duro en defectos moderados a severos (>4mm), que sean tanto horizontales como verticales, en terapia con implantes y cuando exista una cantidad inadecuada de tejido blando.<sup>33,34</sup>

Una altura y anchura de hueso insuficiente obligará a buscar diversas alternativas quirúrgicas; tales como la realización de injertos óseos onlay/inlay, la transposición del nervio dentario, con el consiguiente riesgo de parestesia temporal o permanente, el empleo de implantes cortos, procedimientos de distracción osteogénica, y la regeneración ósea guiada, siendo algunos de ellos muy invasivos y otros presentan un pronóstico desfavorable para una rehabilitación protésica.<sup>34,35</sup>

Las técnicas de aumento de reborde alveolar han tomado en cuenta principios biológicos y físicos para mejorar el potencial regenerativo del huésped. La colocación de diversos materiales de injerto óseo favorecen la cicatrización de los defectos o aumentan los rebordes óseos atróficos con el fin de la colocación quirúrgica de implantes, convirtiéndose en uno de los tratamientos rectores de la odontología implantaria.<sup>10</sup>

#### **3.4.1 Regeneración ósea guiada**

En el año de 1990 Seibert y Nyman, en un experimento en perros cuyo reborde alveolar estaba desdentado y presentaba defectos

vestibulolinguales, lograron la neoformación de hueso en atrofas con la utilización de membranas no reabsorbibles.

Se ha demostrado el éxito de la colocación de implantes a los 6 meses después de este procedimiento, por lo que la regeneración ósea guiada es uno de los métodos de aumento de reborde horizontal más utilizados para el tratamiento de los defectos óseos localizados en los maxilares. Consiste en la colocación de un injerto de hueso (autoinjerto, xenoinjerto, aloinjerto) y de una membrana o malla que permite la regeneración del lecho con hueso y evita que el tejido epitelial y conectivo, invada el lecho ya que estos tejidos presentan una tasa de proliferación más veloz que la del hueso.<sup>10,13</sup>

### **3.4.2 Injertos óseos en bloque**

Es una alternativa para aumentar el reborde alveolar y cubrir defectos óseos mayores localizados donde se requiere aumentar el hueso en sentido vertical; el mismo paciente es el donador y receptor del injerto. Es considerado un injerto autógeno y posee propiedades osteoconductoras y osteogénicas bien documentadas. Los bloques de hueso se pueden obtener de la sínfisis mandibular, o la tabla vestibular de la rama mandibular. Dichos injertos en bloque se deben fijar con microtornillos de fijación.

Los injertos en bloque provenientes de la sínfisis mandibular nos ofrecen mayor dimensión del bloque y un acceso quirúrgico más sencillo, sin embargo existe una alta probabilidad de daño al nervio dentario inferior en su rama terminal mencionada.

Por otra parte los injertos de bloque provenientes de la rama de la mandíbula nos ofrecen menor morbilidad pero la dimensión del bloque a tomar es menor y el acceso quirúrgico es más complejo.

Existe la posibilidad de obtener injertos óseos en bloque de sitios donantes extrabucales como son la cresta iliaca o la calota. Sin embargo, la tasa de resorción es alta, pero se ha estudiado la posibilidad de combinar los injertos autólogos particulados con una membrana de barrera o con xenoinjertos óseos particulados, donde se ha demostrado que la resorción disminuye.<sup>10,13</sup>

### **3.4.3 División/ expansión del reborde**

Fue en 1994 cuando Summers implementó la técnica para aumentar el ancho del hueso, sin embargo en 2007, Katranji y cols comprobaron que el uso de esta técnica se debe de emplear cuando el ancho del reborde alveolar sea mínimo de 4-5mm ya que con esta medida, hay algo de hueso esponjoso entre las corticales cuyo espesor medio va de 1-1.21mm según estudios realizados en cadáveres.

Esta técnica se utiliza en el maxilar para aumentar el ancho del hueso por condensación ósea, por medio de la división u osteotomía de expansión del reborde alveolar, y se hace junto con la colocación simultánea de implantes. Se utilizan cinceles u osteótomos para hacer fracturas longitudinales en el hueso y crear sitios de osteotomía sin necesidad de perforar, conservando el volumen de hueso actual.

El hueso se comprime hacia las paredes laterales con osteótomos de diámetro creciente para incrementar la fuerza y la densidad. La ventaja de esta técnica es el poder colocar el implante del diámetro ideal en la posición necesaria para la restauración, además de la exposición del hueso esponjoso y la médula al sitio del injerto lo que mejora exponencialmente la revascularización y cicatrización, así como la adecuada intergración de injerto óseo particulado que se colocará.<sup>10,12,13</sup>



#### **3.4.4 Aumento vertical del reborde**

No existen los estudios suficientes, ni la evidencia adecuada para poder determinar al aumento del reborde alveolar en sentido vertical como una alternativa adecuada en clases II de Seibert. Dichas técnicas quedan limitadas a operadores experimentados y a muy pocos pacientes.

Sin embargo en rehabilitación con implantes en pacientes totalmente desdentados o parcialmente desdentados donde el espesor puede ser adecuado pero no la altura para poder colocar un implante con altura suficiente, se han creado alternativas quirúrgicas y protésicas.

Dentro de estas alternativas encontramos la elevación del piso del seno maxilar, así como la creación de las casas comerciales de implantes angulados y técnicas como la llamada *All on Four* que consiste en la colocación de cuatro implantes para la sujeción de una dentadura total monomaxilar para pacientes totalmente desdentados.<sup>10-13</sup>

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La pérdida de hueso alveolar compromete las opciones de tratamiento, al igual que el pronóstico de una rehabilitación dental.

Los injertos han sido utilizados en la odontología en los últimos años para preservar o recuperar la estructura ósea consiguiente de la pérdida dental prematura.

En la actualidad existen varios materiales para injertos óseos que cumplen propósitos como servir de osteoconductores, osteoinductores u osteogénicos pero ¿qué tan biocompatible es el xenoinjerto de hueso bovino desmineralizado para técnicas de aumento de reborde alveolar?

#### **V. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad los xenoinjertos son muy utilizados en técnicas de aumento de reborde alveolar por lo que es importante evaluar el comportamiento celular dentro de un andamio de hueso bovino desmineralizado para determinar qué tan biocompatible es, sin comprometer un tratamiento donde se requiera la utilización de un injerto de tejido duro.

## **VI. HIPÓTESIS**

Si a un andamio de hueso bovino descelularizado y desmineralizado se le siembran células mesenquimales de cordón umbilical, estas células no morirán y proliferarán sobre el andamio.

## **VII. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo general**

- Evaluar la biocompatibilidad del hueso bovino con células mesenquimales de cordón umbilical.

### **7.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el proceso de descelularización del hueso bovino.
- Evaluar la citotoxicidad del hueso bovino descelularizado.
- Evaluar la proliferación de las células mesenquimales de cordón umbilical en los andamios de hueso bovino descelularizado.

## VIII. METODOLOGÍA

- Evaluación del proceso de descelularización del hueso bovino descelularizado.

El hueso bovino fue cortado en fragmentos de  $1\text{cm}^3$  y sometido a proceso de desmineralización con ácido clorhídrico y EDTA y descelularizado con SDS al 1%. Protocolo ya establecido y estandarizado en el laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Los fragmentos de huesos una vez descelularizados y desmineralizados se cortaron en  $3\text{mm}^2$ , se tiñeron con DAPI (4' 6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) por 15 minutos y se observaron en el microscopio de Epifluorescencia.

- Obtención de células mesenquimales de cordón umbilical

Las células de cordón umbilical fueron obtenidas de cordón umbilical de cesárea, se lavó y posteriormente se sometió a digestión enzimática con colagenasa y por explante.

Los explantes se mantuvieron en cultivo hasta obtener células (fase 0=P0) haciendo cambios de medio de cultivo cada tercer día con medio DMEM, SFB 10% y antibiótico al 1%. Las células una vez llegando a confluencia se separaron de la caja de cultivo con tripsina al 0.5%/ EDTA 0.2%. El sobrenadante fue recolectado en un tubo falcon de 50mL para centrifugarlo durante cinco minutos a 1,800 rpm para la obtención del botón constituido por las células mesenquimales. Se realizó un conteo de células utilizando una cámara de Neubauer donde se contaron un aproximado de 102,000 células por  $\text{mm}^3$ . Cifra casi en el límite de lo mínimo establecido para el cultivo que son 100,000 células por  $\text{mm}^3$ . Las células obtenidas P1 se sembraron en una caja Petri, hasta llegar a confluencia (figura 4).

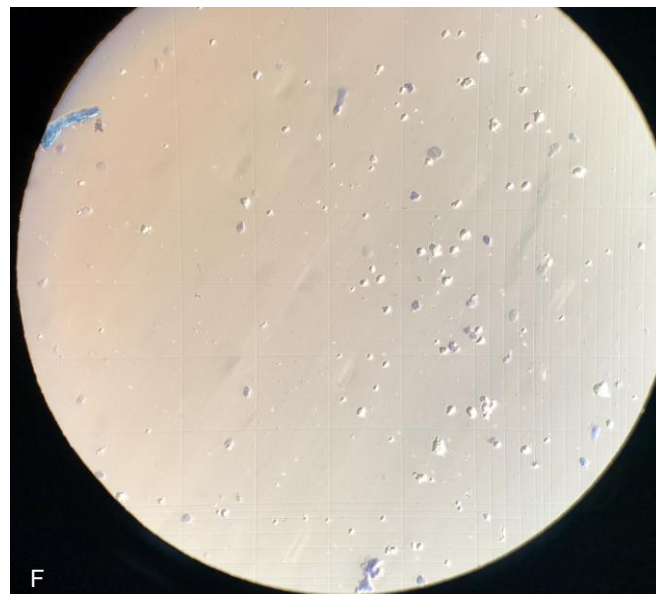
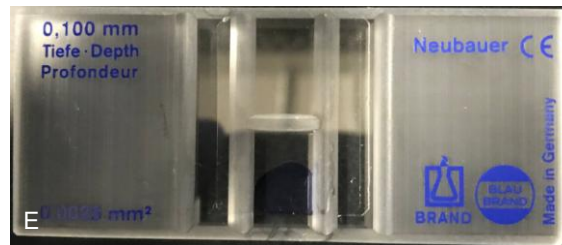
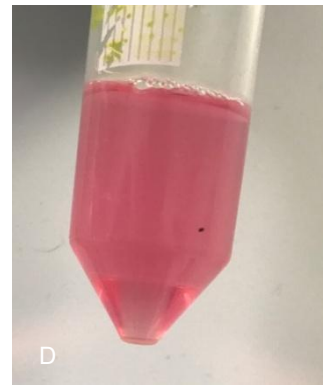
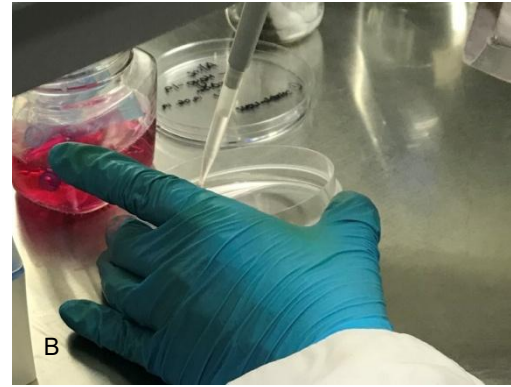
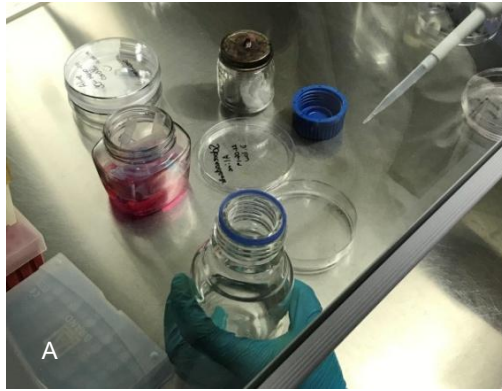


Figura 4 A y B separación de las células de la caja Petri utilizando tripsina al 0.5%/ EDTA 0.2%. C y D Obtención del sobrenadante y precipitado por medio de centrifugación a 1800 RPM durante 5 minutos. E y F Conteo de células utilizando la cámara de Neubauer. Fuente directa

- Ensayo de citotoxicidad y proliferación

Los andamios descelularizados y desmineralizados con tamaño de 3mm<sup>2</sup> fueron esterilizados por luz UV por 30 minutos, posteriormente se coloraron en placas de 48 pozos y se les sembraron 1x 10<sup>5</sup> células mesenquimales de cordón umbilical (figura 5). A las 24 y 48h se tiñeron las células con el kit LIVE/DEAD por media hora, se observaron las muestras en el microscopio de epifluorescencia. Para el proceso de proliferación se empleó el reactivo Presto Blue al 10% sobre los andamios y se cultivó por 5h, posteriormente se tomó el sobrenadante y se leyó en el espectrofotómetro a una absorbancia de 570nm.

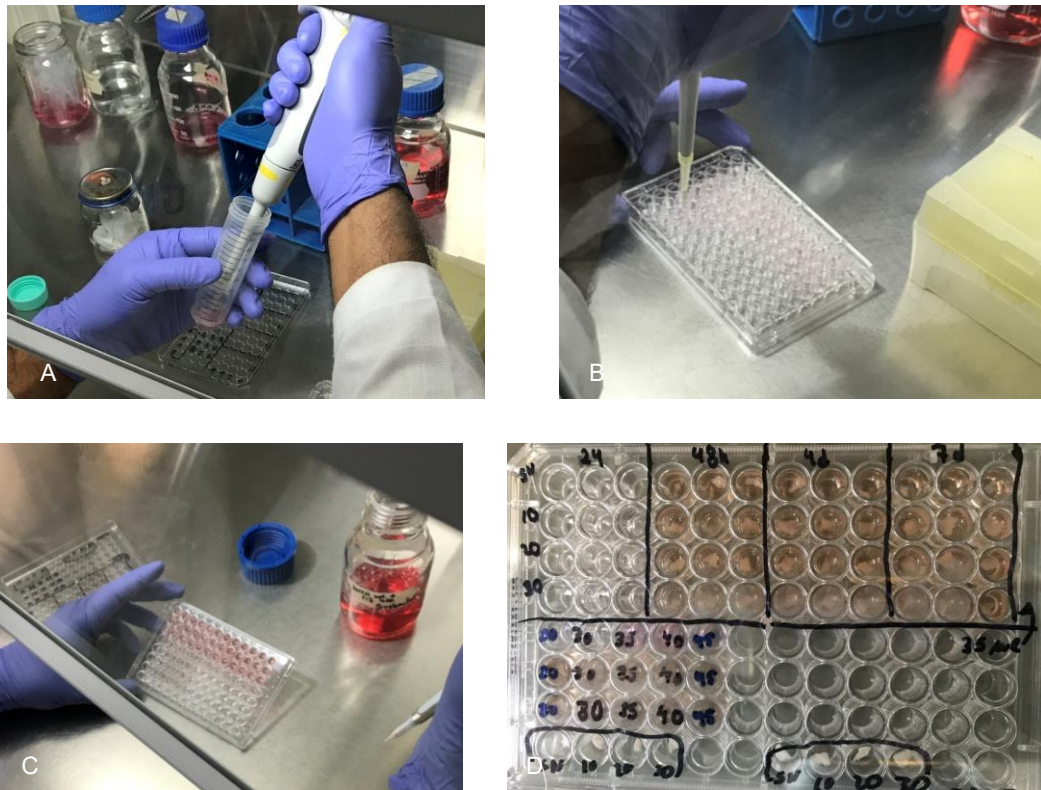


Figura 5 A-D Colocación de células mesenquimales dentro de los pozos para su observación posterior a las 24 y 48 horas, y a los 4 y 7 días. <sup>Fuente directa</sup>

## IX. RESULTADOS

- Evaluación del proceso de descelularización del hueso bovino descelularizado

Siguiendo el protocolo ya establecido y estandarizado en el laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina de la UNAM, se realizó la descelularización de andamios de hueso bovino desmineralizado. Después de teñirlos con DAPI, podemos observar las trabéculas del hueso sin núcleos teñidos. Lo cual indica que el proceso de descelularización se realizó exitosamente (figura 6).

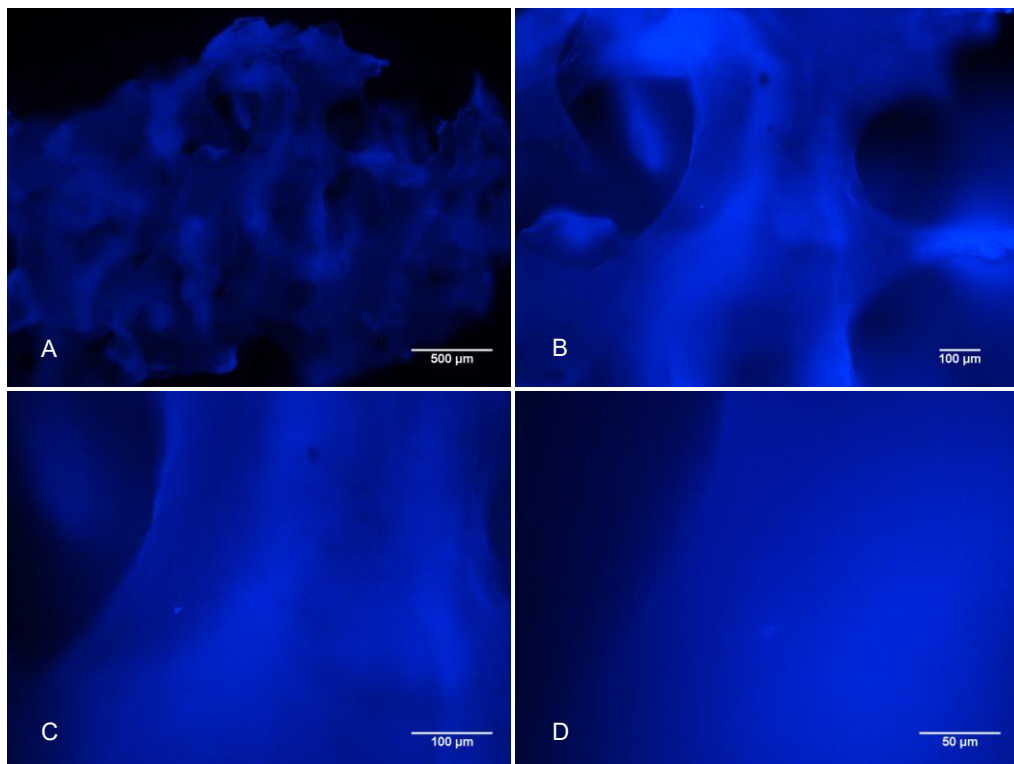


Figura 6 Se observan fotomicrografías de los andamios descelularizados de hueso bovino teñidos con DAPI vistos en el microscopio de epifluorescencia a diferentes aumentos 4x (A), 10x (B), 20x (C) y 40x (D). Fuente directa.

- Obtención de células mesenquimales de cordón umbilical

La figura 7 muestra como las células del cordón umbilical están migrando desde el tejido hacia la superficie de la caja de cultivo.

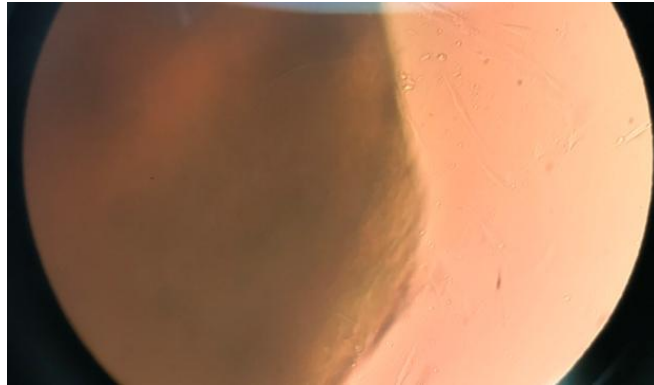
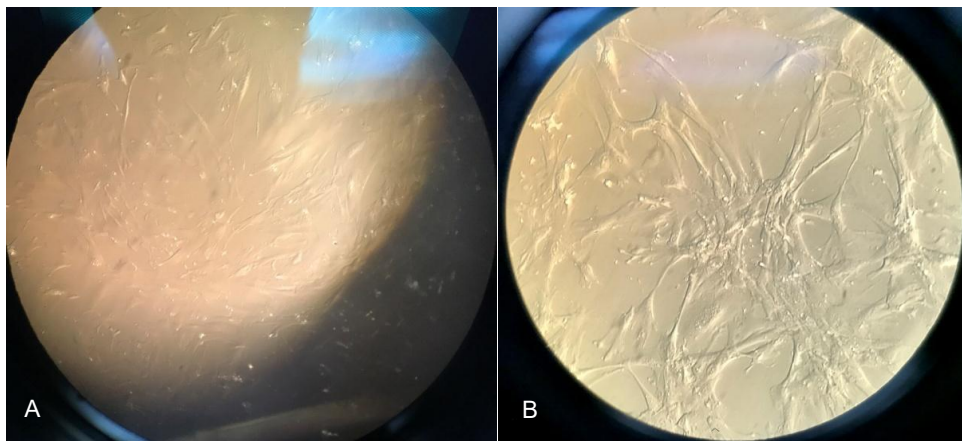


Figura 7 Se observa fotomicrografía de las células mesenquimales migrando hacia la superficie. Fuente directa

Las células P0, obtenidas directamente del explante fueron tripsinadas y expandidas a otra caja de cultivo obteniendo P1. Se cambiaron los medios cada tres días para el crecimiento celular siguiendo el protocolo establecido. Se observaba la caja de Petri que contenían las células mesenquimales de cordón umbilical en el microscopio (figura 8).



Figuras 8 A y B Crecimiento de células mesenquimales de cordón umbilical después de 21 días. Objetivo 10x. Fuente directa

- Ensayo de Citotoxicidad y Proliferación

Una vez sembradas las células mesenquimales de cordón umbilical sobre los andamios descelularizados de hueso bovino después de 24h y 48h de cultivo, se cambiaron los andamios a otra caja de cultivo con la finalidad



de medir sólo la actividad de las células sembrados sobre el andamio, descartando las células adheridas en el plato de cultivo (figura 9-A). La figura 9 muestra un incremento en la actividad mitocondrial evaluada con prestoblue donde B marca el Presto Blue recién colocado en la placa de cultivo y C marca el metabolismo de las células sembradas sobre los andamio después de 5h de cultivo. Finalmente D nos indica la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro.

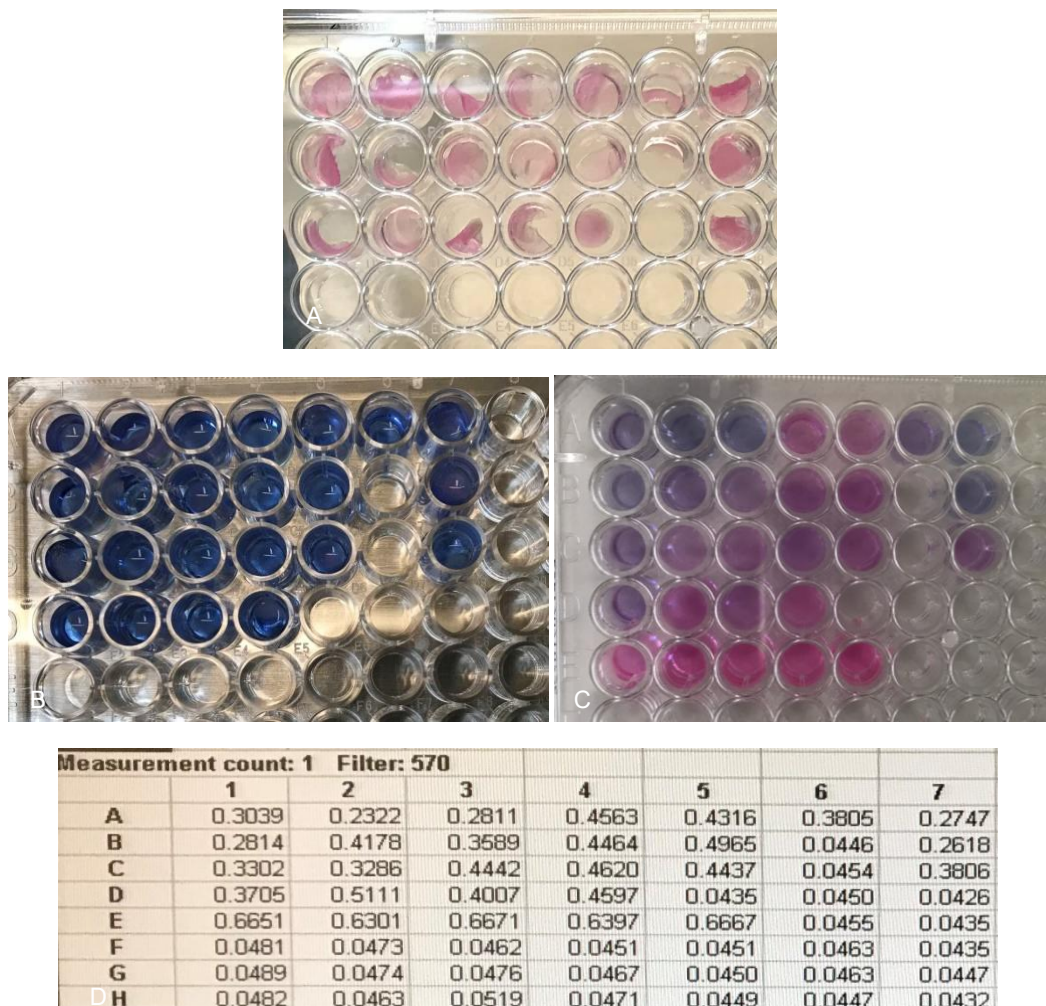
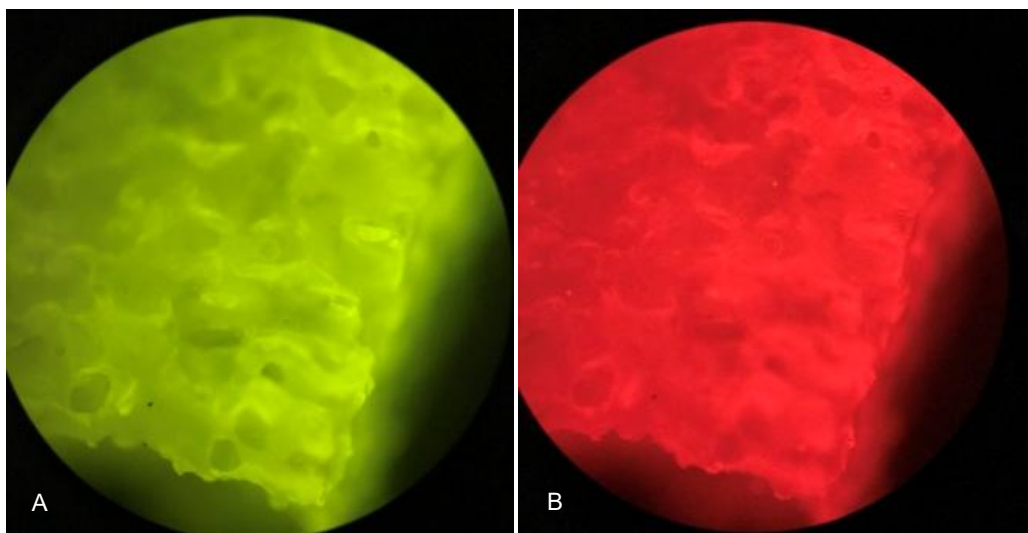


Figura 9 A-D Se preparan las muestras con Presto Blue para evaluar la proliferación celular. Fuente directa

Obtenidos los datos de la lectura del espectrofotómetro podemos observar que según la actividad celular fue el cambio de coloración. Si recordamos, la coloración inicial fue color azul, por lo que los colores más

cercanos al tono inicial indican poca actividad celular (pozo A1). Donde exista un mayor cambio de color, hacia una coloración rosa, es indicativo de mayor cantidad en la actividad celular, como se puede observar en el pozo E5. Por lo que encontramos un aumento de coloración gradual (actividad celular) en dirección diagonal descendente del pozo A1 al pozo E5; se puede corroborar lo mencionado con los datos en la tabla de resultados del espectrofotómetro.

Por otro lado en los andamios de hueso bovino desmineralizado se observaron al microscopio de epifluorescencia para evaluar la biocompatibilidad. Los andamios con células se tiñeron con calceína que tiñe de verde las células vivas y el homodímero de etidio que tiñe de rojo las células muertas. La figura 10 nos muestra la estructura del andamio donde se distingue perfectamente las trabéculas teñidas de verde A y C y las rojas B y D. Finalmente E y F nos muestran las células teñidas con una tonalidad verde intenso.



C ú ...

...Continuación

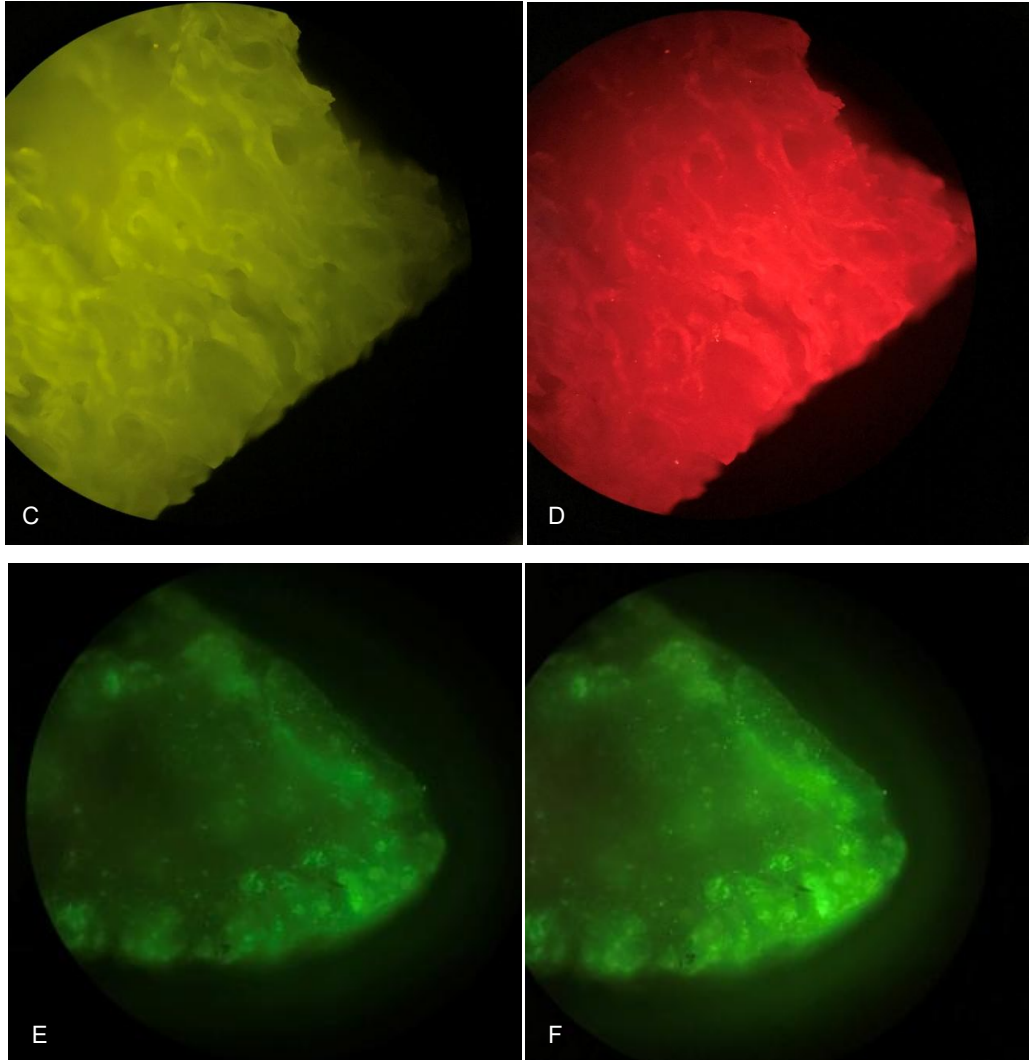


Figura 10 Se observan fotomicrografías de los andamios en microscopio de epifluorescencia con objetivo 4X. A y C se observa la coloración de la calceína que tiñe de verde las células vivas y B y D se observa la coloración del homodímero de etidio que tiñe de rojo las células muertas <sup>Fuente directa</sup>

## **X. DISCUSIÓN**

El aumento del reborde alveolar representa uno de los procedimientos quirúrgicos más recurridos en la odontología protésica, sin embargo existen diferentes alternativas de injertos óseos para la preservación del hueso alveolar o su aumento dimensional.

El hueso bovino representa una alternativa en los xenoinjertos óseos. Por la desmineralización y descelularización que el injerto sufre, su única función es servir como andamio con características de osteoconductividad. Está indicado para aumentos de reborde de tipo horizontal y en regeneración ósea guiada. A su vez en preservación de alveolos postextracción.

El presente estudio evaluó la biocompatibilidad del hueso bovino desmineralizado utilizándolo como andamio para la proliferación celular de células mesenquimales de cordón umbilical, el proceso de desmineralización y descelularización dispuesta por el Departamento de Inmunoterapia de la Facultad de Medicina de la UNAM, la proliferación de células mesenquimales de cordón umbilical en andamios de hueso bovino desmineralizado, así como la citotoxicidad del hueso bovino desmineralizado.

Los resultados de esta investigación confieren en que el hueso bovino desmineralizado es biocompatible y además un excelente osteoconductor ya que al observar los andamios en el microscopio de epifluorescencia, se observaban en las trabéculas del hueso desmineralizado, las células de cordón umbilical vivas con lo que podemos decir hay proliferación celular y carece de citotoxicidad este tipo de injerto óseo.

## **XI. CONCLUSIONES**

El proceso de descelularización del hueso bovino del laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos de la Facultad de Medicina, UNAM, fue el adecuado, esto debido a que DAPI salió negativo lo que indicó que no hay restos celulares en el andamio obtenido.

En cuanto a la evaluación de proliferación utilizando el reactivo Presto Blue en las células mesenquimales de cordón umbilical sembradas sobre el hueso bovino desmineralizado, se encontró que éstas pudieron proliferar a las 24 y 48h. Por otro lado, la evaluación realizada con el kit LIVE/DEAD, indicó que las células estaban vivas al estar teñidas de verde intenso.

El hueso bovino desmineralizado es biocompatible, ya que se demostró que funciona para la proliferación de células mesenquimales de cordón umbilical. A pesar de que no todas las células se encontraron sobre el andamio, en las últimas observaciones de los andamios en el microscopio de epifluorescencia, se observaban núcleos celulares en las paredes de las trabéculas.

## **XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Soto S, Gonzalez M. Injertos óseos. Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial. Rev Cubana Estomatol. 2005; 42 (1).
2. Monzón Trujillo D, Martínez Brito I, Rodríguez Sarduy R, Piña Rodríguez JJ, Pérez Mír EA. Injertos óseos en implantología oral. Rev Méd Electrón. 2014; 36(4).
3. Montalvo C. Biología celular e histología médica tejido óseo. Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México; 2010.
4. Gartner L. Texto de Histología Atlas a color. 4ª edición. México: Elsevier; 2017.
5. Fernández-Tresguerres I, Alobera M, del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E47-51.
6. Levasseur R. Fisiología del tejido óseo. EMC - Aparato locomotor. 2019;52(2): 1-25.
7. Gutiérrez J. El proceso de remodelación ósea. Medigraphic. 2008; 4(3):1-7.
8. Mandalunis, P. Remodelación Ósea. Actualiz Osteología. 2006;2(1):16-18.
9. Gómez M, Campos A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 3ª edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009. pp 83-105.
10. Lang N, Lindhe J. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. 6ª edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2017.
11. Newman M, Takei H, Klokkevold P. Periodontología Clínica de Carranza. 11ª edición. Venezuela: AMOLCA; 2014.
12. Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. Newman and Carranza's Clinical Periodontology. 13ª edición. EEUU: Elsevier; 2018.

13. Vargas A, Yáñez B, Monteagudo C. Periodontología e Implantología. 1ª edición. México: Editorial Médica Panamericana; 2017. pp 22-24, 200-204.
14. Castaño-Granada MC, Roldán-Tamayo N, Arismendi-Echavarría JA, Calle-Muñoz SC. Cambios dimensionales de los tejidos duros y blandos en sitios post-exodoncia. Evaluación de dos biomateriales. Rev Fac Odontol Univ Antioq. 2016; 28(1): 13-33.
15. Di Marco. Italia: Cliccascienze, Autor/es. Título [Internet]. Lugar de publicación: Editor; Fecha de publicación [11 mayo 2018; 2 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.cliccascienze.it/radiologia/radiografias-dentales-caracteristicas-tipos-e-imagenes/>.
16. V W j F D 'A q u F S DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. J Clin Periodontol. 2009; 36: 1048–1058.
17. Tan WL, Wong TLT, Wong MCM, Lang NP. A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. Clin. Oral. Impl. Res. 23(Suppl. 5), 2012, 1–21.
18. Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J: Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. J Clin Periodontol 2003; 30, 809–818.
19. Vittorini Orgeas, G., Clementini, M., De Risi, V., & de Sanctis, M. (2013). Surgical Techniques for Alveolar Socket Preservation: A Systematic Review. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 28(4), 1049–1061. doi:10.11607/jomi.2670
20. Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. Clin. Oral Impl. Res. 23(Suppl. 5), 2012, 22–38.
21. García Gargallo M, Yassin García S, Bascones Martínez A. Técnicas de preservación de alveolo y de aumento del reborde alveolar: Revisión de la literatura. Av Periodon Implantol. 2016; 28, 2: 71-81.
22. Vara J, Bowen A. Tratamiento de las atrofi as óseas maxilares: cirugía

- del seno maxilar. *Gaceta Dental* 170. 2006; 233-252.
23. J. L. Cawood and R. A. Howell. "A classification of the edentulous jaws. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1988; 17:232-236.
  24. Klurfan F. [Internet] NYU College of Dentistry Continuing Dental Education [cited 2019 septiembre 7] disponible en: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.klurfan.com.ar/pdf/monografia\\_nyu.pdf](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.klurfan.com.ar/pdf/monografia_nyu.pdf)
  25. Navarro, C, García F, Ochandiano S. *Cirugía Oral*. 1ª edición. España: Arán Ediciones; 2008. p 197-200, 211.
  26. Chiapasco M, et al. *Tácticas y Técnicas en Cirugía Oral*. 3ª edición. Milano: AMOLCA; 2015.
  27. Rosales-Ibáñez R, Alvarado-Estrada K, Ojeda-Gutiérrez F. Ingeniería Tisular en Odontología. *Revista ADM* 2012; 69(4): 164-167.
  28. Badylak SF. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response. *Ann Biomed Eng.* 2014 Jul;42(7):1517-27.
  29. Escobar M, Linamaría, Aristizábal G, Fabio A. Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae.* 2010 ;17(2) 2010:173-180.
  30. NIH. Diccionario de cáncer [Internet]. Estados Unidos de América: Instituto Nacional del Cáncer; [13 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/proliferacion-celular>
  31. Rahirant S, Garavito Z, Hurtado H. Técnica inmunocitoquímica para evaluar la proliferación de células en cultivo por la incorporación de bromodeoxiuridina. *Biomedica.* 2000;20:144-150.
  32. Thermo Fisher Scientific. P B u ™ C V b y R E U A é : I v ™ [Internet] [10 ub 2019]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A13261#/A13261>
  33. Martínez O, Barone A, Covani U, Fernández A, Jiménez A, Monsalve L, Velasco E. Injertos óseos y biomateriales en implantología oral.



- Avances en odontoestomatología. 2018; 34(3): 111-119.
34. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. Av Periodon Implantol. 2012; 24(3): 133-138.
35. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. Clin. Oral Impl. Res. 17 (Suppl. 2), 2006; 136–159.