



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA RESTAURADORA

**EFFECTIVIDAD DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO  
CON FIBRINA INYECTABLE PARA LA  
REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA EN RATAS WISTAR**

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Autores: Bautista Brenda

Mejía Génesis

Tutor: Prof. Dubraska Suárez

Cotutor: Prof. Gladys Velazco

Mérida – Venezuela, Octubre 2019

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **DEDICATORIA**

Dedicada a nuestros padres, por su confianza, amor e incondicionalidad con nosotras, a ellos le debemos todo lo que somos.

## AGRADECIMIENTO

Al ser supremo por darnos salud y la paciencia para sobrellevar las vicisitudes y grandes retos paralelos y simultáneos a este programa de estudio.

A la Prof. Dubraska Suárez, por apoyarnos y ayudarnos a lo largo de la investigación. Gran amiga y consultora experta de este trabajo, cuyas opiniones y revisiones fueron siempre sinceras y oportunas. Su apoyo fue incondicional incluso en la fase práctica de este trabajo especial de grado. Gracias totales.

A la Prof. Gladys Velazco. Consultora experta de este trabajo también, sus opiniones siempre fueron sinceras y acertadas, y por transmitirnos la pasión por la investigación y a siempre dar lo mejor de nosotras. Gracias.

Agradecemos enormemente al Centro de Investigaciones Odontológicas, por apoyarnos como grupo de investigación, ente del cual recibimos dotación de servicios e insumos.

Infinitas gracias al Bioterio de la ULA, por formarnos y asesorarnos en la fase experimental de la investigación. Un agradecimiento especial a la Md. Veterinario Yepsys Quintero y el Sr Andrés Osorio, especialistas en el manejo y cuidado de animales de laboratotio. Velando siempre por el cumplimiento ético de las investigaciones.

Gracias también al Prof. Noe Orellana, por sus orientaciones y su apoyo en la toma radiográfica de las muestras. Igualmente a la Dra. Rosalba Florido por sus consejos y su conocimiento al momento de observar las muestras histológicamente.

Queremos expresar nuestra gratitud al Prof. Damian Cloquelle y al Prof Elix Izarra por estar siempre al pendiente, asesorarnos y apoyarnos cuando lo requerimos.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	vi
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
1.1 Definición y contextualización del problema .....	3
1.2 Objetivos de la investigación .....	6
1.2.1 Objetivo general.....	6
1.2.2 Objetivos específicos .....	6
1.3 Hipótesis.....	6
1.4 Justificación .....	7
CAPÍTULO II.....	9
MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Antecedentes .....	9
2.1.1 Empleo de la Fibrina inyectable para ROG en cirugía bucal. ....	9
2.1.2 Aplicación de la hormona de crecimiento en combinación con otros biomateriales para ROG.....	10
2.1.3 Investigaciones sobre ROG en ratas wistar con similar metodología de análisis. 11	
2.2 Bases conceptuales.....	12
2.2.1 Biología ósea .....	12
2.2.2 Proceso de regeneración ósea .....	14
2.2.3 Fases de remodelado.....	16
2.2.4 Mecanismo de acción de la ROG .....	19
2.2.5 Tipos de defectos óseos .....	27

2.2.6	Fibrina.....	28
2.2.7	Fibrina rica en plaquetas (PRF) .....	28
2.2.8	La fibrina rica en plaquetas inyectable (i-PRF).....	33
2.2.9	Hormona de crecimiento.....	35
2.2.1	La tibia de la rata Wistar como modelo .....	45
CAPÍTULO III.....		47
MARCO METODOLÓGICO.....		47
3.1	Tipo y diseño de investigación.....	47
3.1.1	Tipo.....	47
3.1.2	Diseño .....	47
3.2	Ejemplares biológicos .....	48
3.3	Sistemas de variables .....	48
3.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	48
3.4.1	Técnica de recolección de datos .....	48
3.4.2	Instrumentos de la recolección de datos.....	48
3.5	Materiales e instrumental .....	51
3.5.1	Materiales para la experiencia quirúrgica:.....	51
3.5.2	Insumos para la eutanasia de los animales.....	51
3.5.3	Insumos para el procesamiento histológico de las muestras.....	52
3.5.4	Instrumentos para la experiencia quirúrgica .....	52
3.5.5	Equipos: .....	53
3.6	Procedimientos, materiales, equipos e instrumentos.....	53
3.6.1	Fase I: Prueba piloto .....	53
3.6.2	Fase II: pre – operatoria. Selección de grupos.....	53
3.6.3	Obtención de la muestra sanguínea .....	54
3.6.4	Obtención de la fibrina inyectable: .....	54
3.6.5	Fase III: Operatoria. Procedimiento quirúrgico.....	55
3.6.6	Fase IV: Post – operatoria.....	56

3.7	Principios bioéticos .....	57
3.8	Análisis de resultados.....	58
CAPITULO IV.....		60
RESULTADOS.....		60
3.9	Hallazgos radiográficos.....	61
3.9.1	Hallazgos radiográficos cualitativos .....	61
3.9.2	Hallazgos radiográficos cuantitativos .....	62
3.10	Hallazgos Histológicos .....	66
3.10.1	Tejido de granulación .....	67
3.10.2	Tejido conectivo .....	67
3.10.3	Hueso inmaduro.....	68
3.10.4	Hueso maduro .....	69
3.10.5	Niveles histológicos de regeneración ósea .....	71
DISCUSIÓN.....		73
CAPITULO V.....		78
3.1	Conclusiones .....	78
3.2	Recomendaciones.....	78
ANEXOS .....		95
3.3	Ficha de recolección de datos histológicos .....	95
3.4	Ficha de recolección de datos radiográficos .....	96

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)





UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA RESTAURADORA

# EFFECTIVIDAD DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO CON FIBRINA INYECTABLE PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA EN RATAS WISTAR

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo

Autores: Bautista Brenda, Mejía Génesis

Tutor: Prof. Dubraska Suárez

Cotutor: Prof. Gladys Velazco

Mérida – Venezuela, octubre 2019

## RESUMEN

En la odontología, se encuentran frecuentemente defectos óseos que ocasionan problemas funcionales y estéticos necesitando de un tratamiento complejo como la regeneración ósea guiada (ROG), la cual es una de las terapias con gran auge y éxito en el ámbito biomédico, pues contribuye a solventar alteraciones óseas por medio de biomateriales capaces de sustituir hueso perdido. La hormona de crecimiento (GH) y la fibrina inyectable (i-PRF), son opciones para estos fines, pues su efectividad en conjunto no ha sido evaluada. **Objetivo:** Evaluar la efectividad de la hormona de crecimiento con fibrina inyectable para la ROG en ratas Wistar. **Metodología:** La investigación fue experimental y fue realizada en el BIOULA, en 23 ratas de la cepa BIOU: Wistar. Se formó 3 grupos; un grupo experimental representado por 21 ratas a las que se le aplicó GH e i-PRF en la tibia derecha, un grupo control con las mismas 21 ratas que recibieron solo i-PRF en la tibia izquierda; y un grupo control-control compuesto por 2 ratas a las cuales no se les realizó ninguna intervención. Las eutanasias fueron realizadas a las 3, 6 y 9 semanas para su posterior análisis radiográfico e histológico de las tibias. **Resultados:** Las pruebas T empleadas para hallazgos radiográficos no arrojaron diferencias significativas en cuanto a la recuperación radiográfica; mientras que la prueba de Kruskal Wallis empleada para los hallazgos histológicos determinó que ambos grupos presentaron recuperación diferente y ambos casos arrojaron diferencias significativas ( $p\_valor \leq 0.01$ ) para el grupo experimental a diferencia del grupo control. **Conclusión:** La GH y la i-PRF fueron efectivos en la regeneración ósea de ratas Wistar

**Palabras Clave:** Hormona de crecimiento, i-PRF, regeneración ósea, biomaterial, Wistar.

## INTRODUCCIÓN

El hueso se puede reparar por sí solo, pero se ha establecido que este hecho no siempre resulta totalmente satisfactorio<sup>1</sup>, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea<sup>2,3</sup>, necesitando factores que estimulen la reparación, por lo que es necesario colocar un material de relleno que posteriormente será reemplazado por tejido nuevo<sup>1</sup>.

La regeneración ósea guiada (ROG) es el nombre con el cual se denomina a aquellas cirugías que se efectúan con la intención de recuperar hueso atrofiado o mantener el ya existente, mediante la utilización de barreras<sup>4,5</sup> que permiten guiar ese proceso de regeneración, aislando las células que no deben participar en éste, fungiendo una matriz en la que las células encuentran un lugar para adherirse, proliferar, y especializarse para formar tejido óseo<sup>6</sup>.

En la búsqueda de nuevos materiales bioactivos para la ROG surge como alternativa la hormona de crecimiento (GH) que es una reguladora impredecible del crecimiento óseo post-natal<sup>7-9</sup>, remodelado óseo<sup>10,11</sup>, y promueve la diferenciación y proliferación de células madre<sup>12</sup>. Estudios demuestran que la GH puede tener un efecto local, cuando es aplicada directamente sobre la zona a tratar debido a que permite la sustitución de biomaterial por hueso a través de la aceleración de la remodelación ósea. Sin embargo, dicha GH requiere de un material para su protección y contención física dentro del defecto óseo<sup>26</sup>.

En este sentido, los andamios ofrecen un nicho protector que permite la liberación de sustancias contenidas en su interior. Al respecto, un biomaterial autólogo que ha sido empleado con éxito en terapias regenerativas y que se perfila como una excelente andamio para ROG es la fibrina inyectable (i-PRF) la cual sirve como excelente vehículo para introducir materiales o tratamientos para estimular la regeneración de tejidos y a su vez funciona como relleno ante defectos óseos<sup>13,14</sup>.

La GH ha demostrado que su aplicación combinada con otros biomateriales en defectos óseos usado en ratas, generan la formación de tejido óseo y el proceso de cicatrización ósea<sup>10,15-21</sup>. Aunque la GH y el i-PRF se han investigado por separado, como tratamientos para la ROG, no se han encontrado estudios previos que planteen

su empleo combinado en cirugía bucal. Por lo que se plantea la realización de un estudio experimental de regeneración ósea incorporando hormona de crecimiento mediante fibrina inyectable como vehículo en ratas Wistar.

La presente investigación surge como una alternativa de tratamiento en el campo de la regeneración ósea guiada, por ser económica, rápida y accesible para el ser humano, utilizando hormona de crecimiento y fibrina inyectable como materiales regenerativos.

Se utilizaron 21 ratas macho de la cepa BIOU: Wistar. Con un peso aproximado de 400 – 420 gr. Se formaron 3 grupos; un **grupo experimental** representado por 21 ratas a las que se le realizó un defecto óseo en la pata derecha y se les aplicó hormona de crecimiento y fibrina inyectable; un **grupo control** donde estuvieron las mismas 21 ratas del grupo anterior, a las que se les realizó un defecto óseo en la pata izquierda y solo se les aplicó fibrina inyectable; y por último, un **grupo control-control** compuesto por 2 ratas a las que no se les realizó ninguna intervención, con motivo a evaluar que los parámetros ambientales no influyeran con el desarrollo y resultado del estudio. Los datos obtenidos fueron evaluados de forma radiográfica e histopatológica, y analizados mediante pruebas de análisis estadístico de acuerdo con el tipo de variables estudiadas.

Este trabajo especial de grado se estructura en cinco capítulos: **El capítulo I** donde se definió y contextualizó el problema de la investigación, seguido de la justificación donde se explica porque se realizó la presente investigación; así como el objetivo general y lo objetivos específicos. **En el capítulo 2** se describen una serie de antecedentes que tienen relación con esta investigación, además, de los supuestos teóricos que sustentan la misma. **Un tercer capítulo** el cual define el marco metodológico de la investigación, donde se presenta el tipo y diseño de la investigación, los ejemplares biológicos, variables a medir, técnicas e instrumentos de recolección de datos, procedimiento que se llevó a cabo, los criterios éticos que rigieron la experimentación en animales y el procedimiento para el análisis de los resultados. **El cuarto capítulo** arroja los resultados radiográficos e histológicos obtenidos y el **quinto capítulo** señala las conclusiones y recomendaciones de la investigación.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Definición y contextualización del problema

En la odontología, se encuentran frecuentemente defectos óseos tales como la pérdida del hueso alveolar o pérdida ósea provocada por la extracción dentaria<sup>22-24</sup>, enfermedad periodontal<sup>25</sup>, quistes, tumores de los maxilares, fracturas, cargas oclusales y/o protésicas mal distribuidas<sup>26,27</sup>, traumatismos, cavidades o recesiones oncológicas que ocasionan problemas funcionales y estéticos necesitando así un tratamiento complejo, como el uso de materiales biocompatibles que permiten restituir las funciones de hueso afectado<sup>28</sup>.

El hueso se puede reparar por sí solo, pero se ha establecido que este hecho no siempre resulta totalmente satisfactorio<sup>1</sup>, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea<sup>2,3</sup>, necesitando factores que estimulen la reparación, por lo que es necesario colocar un material de relleno que posteriormente será reemplazado por tejido nuevo<sup>1</sup>.

En relación a lo anterior, la regeneración ósea guiada es una de las terapias con gran auge y éxito en el ámbito biomédico, pues ha contribuido a solventar alteraciones odontológicas, como la insuficiencia ósea de los huesos maxilares, defectos óseos de grandes magnitudes<sup>6</sup>, defectos óseos encontrados en la enfermedad periodontal, donde dicha regeneración facilita el crecimiento de hueso nuevo<sup>29,30</sup>. La regeneración ósea guiada (**ROG**) es una terapia basada en el mismo principio de la regeneración tisular guiada, el cual es inducir la regeneración y no la cicatrización de defectos óseos, o mantener el nivel óseo ya existente. Se fundamenta en la utilización de sistemas de barrera mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo, excluyendo células provenientes del epitelio gingival y el tejido conectivo en el proceso de cicatrización<sup>31</sup>. La ROG se efectúa con la intención de recuperar hueso alveolar

atrofiado o mantener el ya existente en brechas edéntulas, mediante la utilización de barreras<sup>4,5</sup>. Además, busca recuperar el volumen y la altura vertical para tener como resultado final un terreno protésico óptimo que resista la presión masticatoria<sup>32</sup>.

Por tal razón, se busca acudir a técnicas de regeneración e inducción ósea, que utilicen biomateriales capaces de sustituir el hueso perdido intentando evitar intervenciones añadidas<sup>33,34</sup>, además que, contribuyan a una rápida recuperación de los tejidos y favorezcan el proceso de regeneración ósea guiada en las áreas de extracción; por lo que se ha recurrido a la utilización de sustitutos e injertos óseos en la zona a reparar, y ganar volumen perdido<sup>35,36</sup>. Sin embargo, el elevado costo de estos materiales y la complejidad de las técnicas han limitado su uso, haciendo énfasis en la búsqueda de biomateriales económicos, no tóxicos y de fácil manipulación que mejoren la regeneración de los tejidos duros en tiempo, cantidad y calidad<sup>37,38</sup>.

En este contexto, se ha estudiado el uso de distintas proteínas endógenas, conocidas como factores de crecimiento, entre las cuales se encuentra la hormona de crecimiento (GH) que es una reguladora impredecible del crecimiento óseo post-natal<sup>7-9</sup>, remodelado óseo<sup>10,11</sup>, y promueve la diferenciación y proliferación de células madre<sup>12</sup>, aumentando directamente el crecimiento longitudinal del hueso<sup>39-41</sup>, ejerciendo acciones sobre este que estimulan la actividad de los osteoblastos aumentando su número y función<sup>42-47</sup>. Dicha hormona se transporta en el torrente sanguíneo, una vez libre se une a receptores específicos de las células de múltiples tejidos y estimula la síntesis de otras sustancias denominadas factores de crecimiento<sup>48</sup>, dichos factores regulan su secreción e inhibición, como lo son: IGF-I (factores de crecimiento similares a la insulina), y esteroides sexuales<sup>49</sup>, los cuales desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo del hueso<sup>50-54</sup>.

Adicionalmente, entre las opciones de tratamiento para ROG se ha estudiado la fibrina rica en plaquetas (PRF) un material autógeno con alto concentrado plaquetario, el cual libera factores de crecimiento que optimizan el proceso de regeneración de diversos tejidos, estimulan el proceso fisiológico de la cicatrización y proporcionan alternativas terapéuticas<sup>55</sup>. También permite la proliferación y diferenciación de osteoblastos, favoreciendo el proceso de reparación y regeneración<sup>56</sup>, actuando como

una membrana y al mismo tiempo mantiene una serie de factores de crecimiento responsables de la cicatrización de heridas<sup>57</sup>. Además, contiene todos los constituyentes de la sangre que son favorables para regeneración ósea y tisular<sup>58</sup>. Por lo tanto, este biomaterial es ideal pues contiene efectos positivos en la regeneración de tejidos suaves y duros para preservar la estructura ósea<sup>58</sup>. Se obtiene por la centrifugación autóloga de sangre que no requiere aditivos<sup>59</sup>, también lo podemos obtener en una presentación más soluble o inyectable, cambiando el protocolo de centrifugación, sin desmejorar sus características, obteniendo así el plasma rico en fibrina inyectable o fibrina inyectable (i-PRF)<sup>60</sup>

En este sentido, la GH aplicada tópicamente requiere de un material para su protección y contención física dentro del defecto óseo,<sup>10</sup> por lo que debe usarse un andamio que permita su liberación continua. Al respecto, un biomaterial candidato es el i-PRF el cual está representado por una matriz tridimensional que actúa como un pegamento para las células, factores de crecimiento y otros biomateriales, facilitando así los procedimientos regenerativos<sup>13,61,62</sup>.

Estudios previos, han demostrado que la aplicación de la GH combinada con otros biomateriales en defectos óseos usados en ratas, generan la formación de tejido óseo y el proceso de cicatrización ósea<sup>10,15-21</sup>, así como un crecimiento óseo longitudinal acelerado<sup>63,64</sup>. En conejos, mejoran la reacción ósea peri-implante<sup>65-68</sup>, además, que aumenta la sustitución ósea<sup>69,70</sup> y estimula cartilago<sup>71</sup>. También en perros, mejora la formación de hueso nuevo<sup>72</sup> alrededor de implantes<sup>43,44,73-77</sup>. Y por último, en micropigs acelera la regeneración del tejido óseo neoformado<sup>78</sup>, estimula la reparación ósea con aumento mecánico de fuerza y dureza del callo óseo<sup>79-81</sup>.

En cuanto a la fibrina rica en plaquetas se han encontrado estudios donde se ha combinado la PRF en estado líquido o pre polimerizado (i-PRF) junto a otros biomateriales y demostró servir para la regeneración ósea generando aumento de la cresta ósea y relleno de defectos óseos de gran tamaño<sup>13,14</sup>.

Aunque estos dos biomateriales se han estudiado por separado como tratamientos regenerativos, para el momento de idear este proyecto, se hizo una revisión exhaustiva de la bibliografía en diversas bases de datos como: PubMed, LILACS, Medline, Scielo,

Google Académico, entre otras, y no se encontraron estudios previos que planteen su empleo combinado en la ROG. Partiendo del hecho que el i-PRF puede ser un excelente vehículo para llevar y proteger la hormona en defectos óseos, se planteó la realización de un estudio experimental de regeneración ósea usando la combinación GH e i-PRF en ratas BIOU: Wistar.

## **1.2 Objetivos de la investigación**

### **1.2.1 Objetivo general**

Evaluar la efectividad de la hormona de crecimiento con fibrina inyectable para la regeneración ósea guiada en defectos óseos en ratas Wistar.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Determinar radiográficamente los niveles de relleno óseo a las nueve semanas.
- Determinar radiográficamente la regeneración ósea alcanzada a las nueve semanas post-implantación.
- Determinar histológicamente los niveles de regeneración ósea guiada a las tres, seis y nueve semanas.
- Comparar la regeneración ósea guiada entre el grupo experimental y el grupo control.

## **1.3 Hipótesis**

H<sub>1</sub>: La aplicación de la fibrina inyectable con hormona de crecimiento resulta más efectiva en la regeneración de defectos óseos en ratas Wistar que su aplicación sin carga de hormona.

H<sub>0</sub>: Al comparar la aplicación de la fibrina inyectable cargada con hormona de crecimiento y su aplicación sin carga de hormona, no existen diferencias en la regeneración ósea alcanzada.

## 1.4 Justificación

En los últimos años se han realizado distintas técnicas, enfocadas a activar células osteoprogenitoras para promover relleno óseo con aumento de las mismas sin tomar en cuenta los procesos de mineralización<sup>82</sup>. El hueso autólogo era usado como material de elección por su capacidad osteogénica, pero presenta el inconveniente de requerir anestesia general<sup>83</sup>, implica mayor tiempo quirúrgico, pérdida sanguínea y un costo adicional<sup>84</sup>. Por tanto, se ha hecho énfasis en la búsqueda de materiales económicos, no tóxicos y de fácil manipulación que mejoren la regeneración de los tejidos duros<sup>37,38</sup>. La presente investigación surge como una alternativa de tratamiento en el campo de la regeneración ósea guiada, por ser económica, rápida y accesible para el ser humano, utilizando hormona de crecimiento y fibrina rica en plaquetas como materiales regenerativos lo que podría garantizar el éxito del tratamiento tomando en cuenta el proceso de mineralización del tejido.

Estudios realizados han demostrado que la hormona de crecimiento actúa como agente inductor de la regeneración ósea cuando es aplicada localmente en el interior del defecto óseo en el modelo animal<sup>10,15-19</sup>, y se puede considerar como un posible agente terapéutico a nivel odontológico. Sin embargo, la aplicabilidad clínica de la GH sola no es viable en defectos críticos, debido al colapso que se produciría en los tejidos blandos dentro de la cavidad oral<sup>10</sup>. Por esta razón, se usó la hormona de crecimiento combinada con la fibrina inyectable (i-PRF) el cual es un concentrado plaquetario que libera un mayor número de plaquetas en el sitio de la lesión, lo que produce una cicatrización más rápida, siendo así ventajosa para la regeneración<sup>85</sup>; además, ofrece facilidad de preparación y poco manejo, ejerciendo acciones de proliferación, remodelación y regeneración tisular, además sirve como un excelente vehículo para introducir materiales en la regeneración ósea guiada<sup>86</sup>.

Adicionalmente, la utilización del i-PRF es ahora una tendencia en la ciencia por ser un factor autólogo económico y fácil de obtener; ha despertado el interés investigativo de varios autores comenzando por Choukroun en el 2001 y terminando con Monñare en el 2015 con el protocolo de utilización del i-PRF una familia del PRF,



puesto que éste actúa de excelente manera como sustituto y coadyuvante en la regeneración ósea, asimismo tiene la facilidad de convertirse en hueso<sup>60</sup>.

Se establecieron con éxito varios campos de indicación para el uso de matrices sólidas basadas en PRF solo o en combinación con biomateriales. Sin embargo, en entornos clínicos, existía necesidad de un sistema biológico fluido. En consecuencia, se dirigió un gran interés en ajustar las revoluciones por minuto (rpm) y el tiempo de centrifugación para así lograr la fabricación de una matriz de PRF fluida<sup>87</sup>, obteniéndose así el i-PRF (fibrina rica en plaquetas inyectable), que es la que se usará de vehículo para llevar la GH en esta investigación.

En este contexto, Arrienti<sup>10</sup> expresa que un mayor número de investigaciones nos permitiría la utilización de estos biomateriales con mayor seguridad y predictibilidad. Por lo que se hace necesario aumentar el número investigaciones donde se relacione la efectividad de la hormona de crecimiento con otro material, que en este caso será la fibrina inyectable. Aunado a esto, se han encontrado investigaciones que estudien la efectividad de cada uno de ellos por separado. Sin embargo, no se registraron estudios que evaluaran la combinación de éstos, por lo que fue pertinente la realización de esta investigación.

Por otro lado, la tibia de la rata Wistar como modelo animal permite caracterizar el comportamiento del hueso, en este caso para un defecto óseo no crítico y bajo ciertas condiciones los datos obtenidos pueden ser útiles en modelos de simulación para realizar análisis con modelos computacionales<sup>88</sup> pudiendo presumirse del éxito del tratamiento.

Los códigos de éticas nacionales e internacionales establecen que cualquier investigación realizada en seres humanos debe ser diseñada en relación a los resultados previos de investigaciones realizadas en animales de experimentación<sup>120</sup>. De obtener resultados positivos donde se garantice que estos biomateriales no generen efectos adversos, se podrían realizar experimentos de mayor nivel o alcance empleando los biomateriales previamente mencionados en seres humanos.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes**

En este capítulo se consideran aspectos teóricos fundamentales, donde se incluyen estudios previos que guardan relación con la presente investigación. Los siguientes antecedentes se presentarán por orden temático. Primero se desarrollará un antecedente donde se emplea fibrina inyectable en diferentes presentaciones y combinado con otros biomateriales que fueron aplicados en cavidad bucal y segundo se desarrollará antecedentes de hormona de crecimiento en distintas temáticas.

##### **2.1.1 Empleo de la Fibrina inyectable para ROG en cirugía bucal.**

Lorenz et al<sup>13</sup>, en el 2018 realizaron un estudio en Alemania donde aplicaron por primera vez una combinación de un hueso xenogénico y plasma rico en fibrina (PRF) en 2 presentaciones: estado sólido y líquido. Se usó una malla de titanio 3d individualizada la cual fue rellena con los biomateriales antes mencionados con la finalidad de reconstruir un defecto óseo dentro de la mandíbula de una paciente de 61 años. Los resultados histológicos confirmaron que el hueso nuevo dentro de la región tratada se originó del hueso residual. En conclusión, la adición de ambas matrices de PRF sirven como sistema de administración de medicamentos que pueden ayudar a proporcionar la formación de nuevo hueso, especialmente en casos de grandes defectos óseos sin necesidad de transferencia ósea autóloga<sup>13</sup>

Chenchev et al<sup>14</sup>, en el 2017, realizó un estudio en un paciente de 18 años con expulsión del 11 el cual presentaba fractura parcial de la cresta alveolar donde se usó material de injerto óseo, plasma rico en fibrina inyectable (i-PRF) y fibrina rica en plaquetas enriquecida con leucocitos (A-PRF). Los resultados clínicos se revisaron 4 meses evidenciando aumento de la cresta alveolar; dicho postoperatorio transcurrió sin

incidentes y el control de exploración mostró buena organización del nuevo hueso permitiendo la colocación de un implante dental. El objetivo de este estudio fue evaluar la posibilidad de aumento de la cresta alveolar en la región frontal del maxilar, utilizando los tres biomateriales nombrados anteriormente. Los autores concluyeron que los resultados clínicos y radiográficos fueron exitosos y sugirieron que el uso de A-PRF e i-PRF puede ser beneficioso para el aumento óseo de la cresta alveolar<sup>14</sup>.

### **2.1.2 Aplicación de la hormona de crecimiento en combinación con otros biomateriales para ROG.**

Arrienti<sup>10</sup>, en el 2016, realizó un estudio experimental en la Universidad de La Plata en Argentina donde usó hormona de crecimiento (GH) sola y GH combinada con un material de injerto óseo de origen bovino, con el fin de evaluar la acción de ésta para la regeneración ósea. Uso 15 ratas de la cepa Wistar, dividiéndolos en 3 grupos, a cada animal le realizó una perforación en el fémur izquierdo. Al grupo 1 le injerto la combinación de la GH con un vehículo de matriz mineral de hueso bovino, al grupo 2 solo la GH y al grupo 3 no le injertó ningún material en el defecto. A los 30 días los animales fueron sacrificados, y sus fémures resecados, con la finalidad de obtener muestras para su estudio histológico, resultando que la mayor cantidad de regeneración fue obtenida con el injerto combinado con GH, seguida por la GH sola, y por último el defecto sin ningún material, concluyendo así que la GH actúa como agente inductor de la regeneración ósea, sin embargo, la aplicabilidad sola no es viable para defectos críticos, por lo que es factible el uso asociado a un material de relleno, como se realizará en nuestra investigación.

Emilov et al<sup>70</sup>, en el 2014 realizaron un estudio en 15 conejos de la raza Nueva Zelanda usando como biomateriales: cemento de fosfato tricálcico (TCP), hormona de crecimiento humana (GH) y plasma rico en plaquetas (PRP), Cada conejo fue intervenido en ambas tibias donde se le realizó un defecto de 6 mm. Dichos animales se repartieron en los siguientes grupos: Grupo control (regeneración solo con TCP), Grupo PRP (regeneración con TCP + PRP), Grupo GH (regeneración con TCP + GH), todos los animales fueron sacrificados a los 28 días. Se valoró el aspecto del defecto

crítico comprobando su relleno. Histológicamente valoraron la respuesta tisular, la presencia de tejido óseo neoformado, y el aspecto del biomaterial. Se realizó la morfometría con analizador de imágenes. El aspecto macroscópico del defecto crítico, fue mejor en el grupo PRP y en el grupo GH que en el grupo control. Histológicamente se observó mayor neoformación ósea en los grupos PRP y GH. Los autores concluyeron que la GH facilita la regeneración ósea en defectos críticos.

También, en 2015 , Requía, et al<sup>49</sup>, en Brasil estudiaron la acción de la hormona de crecimiento humana (rhGH) en osteointegración de implantes de titanio en tibias de conejos. En cada animal colocaron 2 implantes de titanio en la tibia izquierda. En el grupo de ensayo, antes de la colocación del implante administraron GH en polvo liofilizado. En el grupo control sólo colocaron los implantes. Los animales se sacrificaron a los 14 y 42 días después de la cirugía, y se prepararon muestras para la prueba biomecánica y el análisis histológico. Los resultados mostraron menor valor de tracción para el grupo control y mayor para el grupo de ensayo. Además, este grupo presentó reparación ósea acelerada y una etapa más avanzada de remodelación ósea. Dichos resultados reflejan que el uso tópico de rhGH induce hueso nuevo en las primeras etapas de la reparación ósea y por esto acelera la osteointegración de implantes dentales de titanio.

### **2.1.3 Investigaciones sobre ROG en ratas wistar con similar metodología de análisis.**

Olivares O y Pineda V<sup>89</sup>, realizaron en el año 2017 el cual tuvo por objetivo determinar la efectividad de la Hidroxiapatita FOULA en el proceso de regeneración ósea guiada en defectos óseos creados en tibias de ratas *BIOU:Wistar*. Su **metodología** se basó en crear un defecto óseo en ambas tibias traseras, la tibia derecha alojó el biomaterial, dejando la izquierda libre del mismo. Se formaron 2 grupos experimentales de 15 animales por tipo de Hidroxiapatita (FOULA y Coralina); estos se dividieron en grupos de 5 animales, de acuerdo al tiempo de estudio (3, 6 y 9 semanas). Los datos se evaluaron radiográfica e histopatológicamente. **Resultados:** El promedio de RO resultó mayor con Hidroxiapatita-FOULA ya que radiográficamente

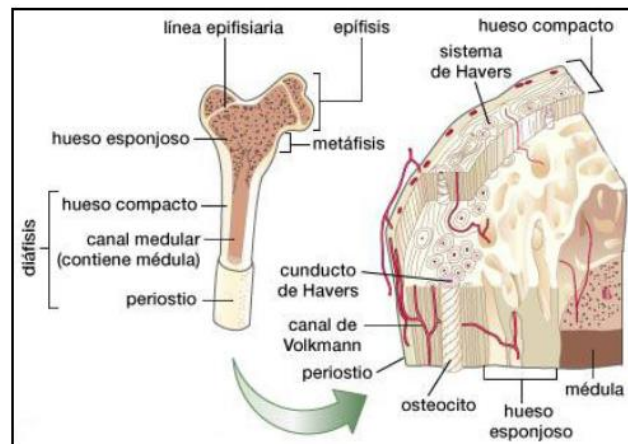
alcanzó niveles 3 y 4 de RO, en contraste con el nivel 3 obtenido por la HA-Coralina; e histológicamente, los niveles fueron nivel III de RO (HA-FOULA) y nivel II (HA-Coralina). No obstante, a las 6 y 9 semanas aumentó a Nivel IV, el porcentaje de RO, usando HA-Coralina. **Conclusión:** La HA-FOULA resultó eficaz en el proceso de regeneración ósea en defectos creados en tibias de ratas *BIOU:Wistar*.

## 2.2 Bases conceptuales

### 2.2.1 Biología ósea

Para comprender el principio de la técnica, es imperante comprender los procesos biológicos que se suceden en la fisiología ósea. El hueso es el principal componente del esqueleto que posibilita la acción mecánica de la musculatura, protege órganos vitales y alberga la médula ósea hematopoyética. Su matriz orgánica o sustancia osteoide sirve además de reservorio de calcio, fósforo y otros iones<sup>51</sup> como una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular, en la integridad y función del tejido óseo<sup>90</sup>.

Histológicamente, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está formado por osteonas estructurado en laminillas de matriz osteoide mineralizada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers por donde pasa el paquete vasculonervioso para darle nutrición al tejido. Dichos conductos están recubiertos de laminillas en disposición concéntrica, dejando unas lagunas u osteoplastos donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares o canal medular en cuyo interior se encuentra la médula ósea (Figura 1)<sup>91</sup>.



**Figura 1.** Estructura del hueso

**Fuente:** <http://www.ferato.com/wiki/index.php/hueso>

Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral<sup>53</sup>. Dicha matriz orgánica o sustancia osteoide, está conformada principalmente por el colágeno tipo I (90%). La otra porción restante está representada por colágeno tipo III, proteínas no colágenas (Proteoglicanos, Proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico, Glicoproteínas, Proteínas procedentes del plasma, Factores de Crecimiento) cuya expresión se encuentra marcada durante la osteogénesis, crecimiento y diferenciación celular. La fase mineral del hueso está constituido principalmente por cristales de Hidroxiapatita (fosfato tricálcico) y carbonato cálcico y otras sales minerales (magnesio, flúor) que se depositan por cristalización en el entramado formado por las fibras de colágeno, luego por acción de la fosfatasa alcalina se induce el proceso de mineralización<sup>91</sup>.

Asimismo, el tejido óseo alberga varios tipos de células (Figura 2), bien sea alojadas dentro del propio tejido óseo; o en el estroma de la médula ósea, el cual es rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (stem cells o mal llamadas “células madres”). Estas células mesenquimales, según sea el mecanismo de señalización molecular específico para que cada tipo de célula se especialice, pueden dar origen a cinco líneas celulares: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos<sup>91</sup>.

ESTROMA MEDULAR	CÉLULAS EN QUE SE DIFERENCIAN EN EL TEJIDO ÓSEO
Stem cells hematopoyéticas	Osteoblastos
Stem cells mesenquimales	Pre-osteoblastos
Adipocitos	Osteocitos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-osteoclastos
Células endoteliales	Células linfoides

**Figura 2.** Células óseas.

Fuente: Suarez D. 2012<sup>90</sup>.

### 2.2.2 Proceso de regeneración ósea

Una lesión en los huesos maxilares, se recupera siguiendo las etapas del proceso de cicatrización del hueso intramembranoso<sup>55</sup>, es decir, formación de hueso sobre las membranas de tejido conectivo fibroso, a partir del mesénquima sin pasar por una etapa cartilaginosa. Dentro del marco de todo este proceso de osificación existen 3 mecanismos de control óseo que resultan básicos y se describen en la siguiente figura<sup>92</sup>.

Mecanismo	Descripción
Osteoinducción	Transformación de células precursoras en células osteogénicas
Osteogénesis	Las células osteogénicas forman depósitos de matriz mineralizada
Osteoconducción	Formación de hueso sobre la superficie de un andamio (matriz colágena fisiológica o el andamio implantado)

**Figura 3.** Procesos implicados en la neoformación ósea.

Fuente: Suarez D. 2012<sup>90</sup>.

Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. De igual modo en este proceso será fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización. Se trata de un constante proceso de remodelación ósea que sucede durante toda la vida. A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas Unidades Básicas Multicelulares. En el esqueleto humano existen 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años, permitiendo la homeostasis del metabolismo fosfocálcico<sup>92</sup>.

Ante un daño que rompe la continuidad del hueso y como solución a ello se implanta un biomaterial, éste debe actuar como estímulo biológico para la especialización celular propio del tejido óseo; es decir que logra la osteoinducción. Se indica un biomaterial osteoinductivo mientras menor número de paredes óseas tenga el defecto óseo<sup>92</sup>.

En la osteoconducción el biomaterial proporciona un andamio o scaffold en el que se depositan las células progenitoras y todo tiene lugar en la bioquímica necesaria para el crecimiento óseo y mineralización de la matriz ósea. En el caso de los andamios tridimensionales su función es decisiva en esta fase; mientras que las membranas logran este propósito siempre que sean porosas de forma tal que en dichos poros logren adherirse las células y comenzar desde allí la siguiente etapa<sup>92</sup>.

En la Osteogénesis, la deposición de nuevo hueso por parte de estas células osteogénicas se da después de la osteoconducción, y generalmente es un proceso donde solo participa el organismo y no tiene tanto protagonismo el biomaterial. Sin embargo, hay biomateriales que histológicamente han demostrado estimular la osteogénesis, como es el caso del plasma rico en plaquetas. Existen dos tipos de osteogénesis: osteogénesis a distancia y osteogénesis de contacto. En la primera, el tejido óseo se forma desde la superficie del hueso circundante. En la segunda, la formación de tejido óseo se produce desde la superficie del implante<sup>92</sup>.



En la osificación es imprescindible el correcto rol de las células, la matriz extracelular y los vasos sanguíneos. La secuencia de procesos biológicos que se suscitan en la regeneración ósea discurre en el siguiente orden:

- Respuesta inflamatoria y formación de hematoma inicial, con eritrocitos, plaquetas y fibrina (sangrado y coagulación).

- Las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales.

- Las señales moleculares anteriores promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial (fibroplasia y angiogénesis).

- Degradación del coágulo y limpieza de la herida (incluida la biodegradación parcial o total de la membrana).

- Formación de tejido granular.

- Síntesis proteica y mineralización de nuevo hueso.

- El hueso aparece inicialmente en forma de red constituida por trabéculas (el hueso esponjoso primario).

- El hueso esponjoso primario es sustituido por hueso secundario, posteriormente eliminado para eliminar la médula ósea, o transformarlo en hueso cortical primario mediante la ocupación de los espacios entre las trabéculas.

- Modelado (modificaciones en el tamaño y forma del hueso en función de reabsorción y aposición ósea) y remodelado óseo (transformación del hueso inmaduro, de tipo esponjoso, en hueso laminar más compacto) 40,57. Respecto a ésta última fase a continuación se detallan cada uno de los eventos que ocurren durante el remodelado<sup>90</sup>.

### 2.2.3 Fases de remodelado

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases<sup>93</sup>: (Figura 4)

1. **Fase quiescente:** se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aun no son conocidos
2. **Fase de activación:** los factores locales y sistémicos inician la activación del remodelado óseo por células osteoblásticas. En esta fase se activan,

migran y se diferencian las células hematopoyéticas precursoras de la estirpe osteoclástica para que de su diferenciación surjan los osteoclastos. También los factores generales (hormona paratiroides, metabolitos de la vitamina D, osteocalcina) y locales (citoquinas: IL-1 y TNF- $\alpha$ ) activan el proceso de remodelado por mecanismos variados.

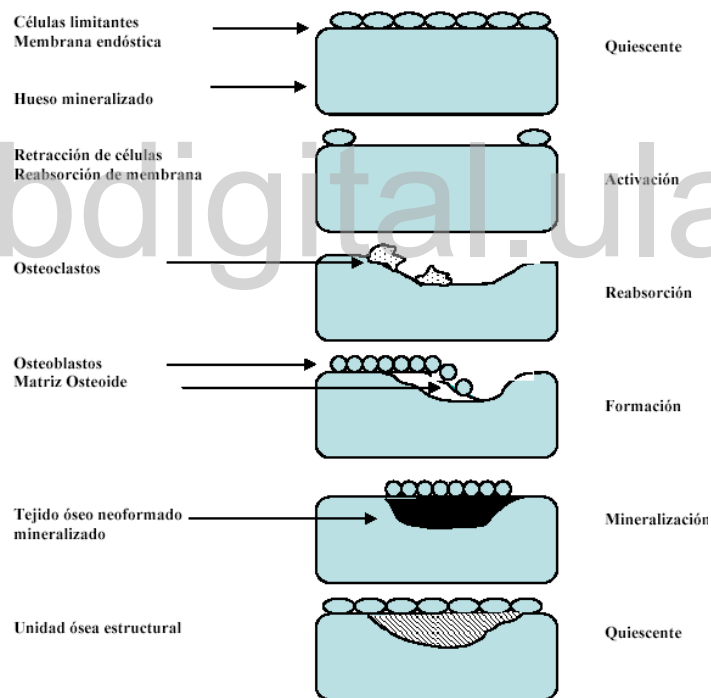
El primer fenómeno que sucede es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos 58, 59,60.

3. **Fase de reabsorción:** Posteriormente los osteoclastos comienzan a desintegrar la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide mediante fosfatasa ácida y enzimas proteolítica liberando mineral óseo y fragmentos colágenos quedando unas cavidades llamadas lagunas a las cuales se desplazarán los osteoblastos en la siguiente fase para producir nuevo hueso. También los osteoblastos producen osteoprotegerina, o factor inhibidor de la osteoclastogénesis, cuyo papel es frenar la actividad del osteoclasto. Al finalizar la actividad resortiva, los macrófagos eliminan a los osteoclastos y permiten la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz. Dura de 1-3 semanas.

4. **Fase de formación:** Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan proteínas morfogenéticas óseas, responsables de la diferenciación en osteoblastos maduros (osteocitos). A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar colágeno tipo 1 y otras sustancias (osteocalcina) para formar la sustancia osteoide, de naturaleza

orgánica que rellenará las zonas perforadas. Esta fase puede durar hasta 1-3 meses y la aposición de la nueva matriz se realiza por capas de forma ordenada.

5. **Fase de mineralización:** A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular; nuevamente empieza la fase quiescente o de descanso. Por lo tanto, la neoformación ósea es un proceso que puede ocurrir alrededor de las 16 semanas, con variaciones asociadas al tipo de defecto y tamaño, así como diferencias individuales en el metabolismo óseo e inmunocompetencia. Figura 4.



**Figura 4.** Fases del remodelado óseo<sup>93</sup>

La neoformación ósea es un proceso que puede ocurrir alrededor de las 16 semanas, con variaciones asociadas al tipo de defecto y tamaño, así como diferencias individuales en el metabolismo óseo, e inmunocompetencia. No obstante, La formación de nuevo tejido óseo visto como imagen típica radiopaca puede ser evaluado

radiográficamente después de 45 días, debido a que este es el tiempo que tarda la fase de mineralización<sup>90</sup>.

A continuación a manera de resumen se representa gráficamente (Figura 5) el proceso de regeneración ósea en función del tiempo:

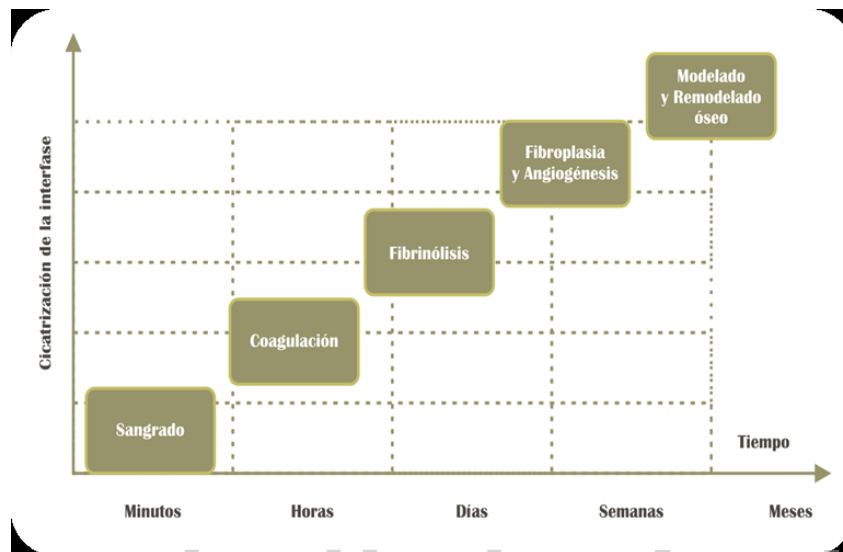


Figura 5. Etapas biológicas que sigue la cicatrización de la interfase hueso-membrana o biomaterial para la ROG. Tomado de Sfeir y cols.

Aunque el organismo está preparado para acudir a este proceso de neoformación ósea constantemente para subsanar las microfallas del sistema óseo, en muchas oportunidades, la influencia de muchos factores ya mencionados con anterioridad, en especial el tamaño del defecto óseo e intensidad de la injuria, retrasan este proceso de cicatrización, pudiendo no consolidarse la herida. Afortunadamente la ingeniería de tejidos en su avance nos presenta un abanico de posibilidades para estimular la regeneración ósea, alternativas cuyo éxito radica principalmente en los biomateriales usados para tal fin<sup>90</sup>.

#### 2.2.4 Mecanismo de acción de la ROG

Antes de definir la técnica de ROG es pertinente conceptualizar la Regeneración Tisular Guiada como técnica matriz. Se entiende por regeneración la respuesta tisular que ante un trauma (mecánico o infeccioso) consigue la restitución a integridad, es decir el nuevo tejido conserva las características idénticas al original; a diferencia de la

reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original<sup>94</sup>.

La ROG es una terapia para inducir la regeneración de defectos óseos o mantener el nivel óseo ya existente en zonas edéntulas. Se fundamenta en la utilización de sistemas barrera mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo (Figura 6), excluyendo células provenientes del epitelio gingival y el tejido conectivo en el proceso de cicatrización<sup>6, 63</sup>. Sin embargo, la técnica va más allá de la simple colocación de membranas, se trata de toda terapéutica basada en el uso de biomateriales bioactivos, implantándolos en el sitio de la lesión ósea, con el fin de promover la regeneración a integridad del tejido<sup>94</sup>.



**Figura 6.** Procedimiento para aplicar la regeneración ósea guiada en herida alveolar.

Tomado de <http://www.procini.com/images/gbr.jpg>

Tradicionalmente los defectos óseos se han tratado implantando tejidos autólogos (Autoinjertos de fragmentos de hueso del paciente), alogénicos (o Aloinjertos de hueso de cadáver acelular procesado), xenogénicos (o Xenoinjertos: porciones de hueso provenientes de animales) o en otros casos implantando materiales sustitutos sintéticos o también llamados materiales aloplásticos inertes (metales, plásticos, cerámicos y vitrocerámicos)<sup>94</sup>.

Todos tienen ventajas y desventajas asociadas, pero llama poderosamente la atención lo útiles que han resultado los de origen natural como el plasma rico en

plaquetas, el plasma rico en fibrina, y otros de origen natural pero provenientes de la geología marina como la hidroxiapatita, y derivados de crustáceos como la quitina, el quitosano, cuyas propiedades superan abismalmente a los tradicionales membranas no reabsorbibles y la mayoría de materiales de relleno óseo<sup>94</sup>.

Adicionalmente, se debe conocer cuáles son los biomateriales que sirven como relleno óseo y como membranas de ROG, según su función en los procesos de control óseo, de forma tal que posea un sin fin de criterios científicamente establecidos a la hora de tomar una elección. A continuación en la Tabla 3 se resumen los biomateriales para ROG de acuerdo a su la interacción con el tejido receptor y su papel en la neoformación ósea<sup>94</sup>.

Mecanismo de neoformación ósea	Tipo de material según su origen	Ejemplos
<b>OSTEOCONDUCTORES:</b>	<b>Aloplásticos</b> (cerámicas bioactivas) Cerámicas de vidrio bioactivas	Hidroxiapatita Carbonato de calcio Fosfato tricálcico Sulfato de Calcio Polímeros sintéticos (politetrafluoretileno)
	<b>Xenoinjertos</b> (heterólogo u origen animal)	Metálicos (oro, titanio, platino) Bifásicos o combinaciones Hueso animal Desproteínizado Colágeno bovino, porcino Cartilago
<b>OSTEOINDUCTORES:</b>	<b>Aloinjertos</b> (homólogos o de donantes fallecidos)	Hueso humano congelado Hueso humano liofilizado
	<b>Autólogos (autoinjertos o tomados del mismo individuo)*</b>	Hueso autólogo Colágeno autólogo Proteínas derivadas del plasma rico en plaquetas (PRP) Proteínas morfogenéticas (BMP) Células madre
	<b>Nuevos biomateriales heterólogos</b>	Derivado de matriz del esmalte Quitosano Transplante de tejidos propios o creados in vitro
<b>OSTEOGÉNICOS:</b>	<b>Autógenos</b>	Hueso autólogo, Plasma Rico en Plaquetas

**Figura 7.** Clasificación de los biomateriales para ROG.  
Fuente: Suarez D.

#### **2.2.4.1 Indicaciones de la ROG**

De acuerdo con los protocolos y guías de práctica clínica en cirugía bucal, las indicaciones más comunes para realizar la ROG son<sup>22,90,95-97</sup>:

1. Aumento de reborde alveolar.
2. Defectos óseos de 2 y 3 paredes.
3. Pacientes que presentan atrofia severa en los procesos alveolares (edentulismo parcial o total), con la finalidad de insertar implantes dentales.
4. Con la colocación simultánea de implantes en alvéolos post-extracción inmediata.
5. Con la colocación de implantes en alvéolos post-extracción no inmediata.
6. Durante el tratamiento implantológico, en caso de fenestraciones.
7. Defectos en dehiscencia.
8. Defectos de resecciones oncológicas.
9. Pérdida de sustancia ósea de etiología traumática.
10. Tras la realización de una quistectomía, apicectomía.

#### **2.2.4.2 Contraindicaciones de la ROG**

1. Defectos óseos de 1 pared (salvo que sea extenso el defecto).
2. Pacientes con patología sistémica no controlada.
3. Pacientes sometidos a radioterapia de cabeza y cuello.
4. Pacientes bajo tratamiento con bisfosfonatos.
5. Individuos de edad avanzada donde la intervención quirúrgica pueda comprometer su estado de salud.
6. Lesiones tumorales, quistes o lesiones agresivas (luego de su resección quirúrgica, no se puede aplicar plasma rico en plaquetas por su alto contenido en factores de crecimiento).
7. Procesos activos y agudos de infección<sup>90</sup>.

### **2.2.4.3 Condiciones indispensables para lograr el éxito tras la aplicación de Regeneración Ósea Guiada**

Se ha determinado que para lograr el éxito de la técnica de regeneración, se deben dar una serie de condiciones predecibles para formar nuevo hueso<sup>98</sup>:

- Debe evidenciarse la presencia de células osteogénicas. La regeneración ósea guiada se fundamenta en la presencia de tejido óseo en el lugar del defecto o cercano a éste.
- Es esencial un apropiado aporte vascular, éstos proceden de la superficie ósea, canales de Havers, canales de Volkman y compartimientos medulares.
- El defecto debe hallarse parcialmente estable durante el desarrollo de la regeneración.
- Se debe crear y mantener un espacio adecuado entre la superficie ósea y la membrana.
- Deben estar excluidas las células del tejido conectivo para formar un espacio donde la membrana pueda actuar como barrera semioclusiva, ya que debe tener poros para la oxigenación del tejido y la adhesión celular.
- El material implantado debe ser biocompatible.
- El material debe ser biodegradable en productos no tóxicos.
- Si el material actúa como relleno óseo debe ser totalmente reabsorbible en un tiempo que oscile entre 6 y 12 meses, ya que será sustituido por el nuevo hueso.
- El material debe ser suficientemente estable para permanecer en su sitio durante 6 semanas como mínimo.

### **2.2.4.4 Requerimientos en el diseño y elección de un andamio para regeneración ósea guiada**

	<b>Integración adecuada al tejido hospedero sin presentar efectos genotóxicos, citotóxicos o causar reacciones de hipersensibilidad. Hay 4</b>
--	--



<p><b>Biocompatibilidad</b></p>	<p>tipos de respuestas descritas como biocompatibles: a. Inerte: generan poca o ninguna respuesta. b. Interactivo: generan una respuesta específica y beneficiosa. c. Viable: con incorporación de células vivas, que son reconocidos por el organismo como tejido normal. d. Materiales implantables consistentes de tejido nativo, desarrollado in vitro a partir de células del paciente.</p>
<p><b>Biodegradabilidad</b></p>	<p>Posible solo con los biomateriales de tercera generación o biodegradables. Debe permitir su hidrólisis, decrecimiento del peso molecular, rompimiento de sus enlaces y la reducción de la rigidez del andamio, dando paso a la regeneración ósea mientras se produce la degradación del andamio.</p>
<p><b>Osteoinductividad:</b></p>	<p>Sea por su bioactividad o por su configuración física, debe dar alojamiento adecuado para que ocurra la migración y diferenciación celular hacia la línea osteogénica</p>
<p><b>Propiedades mecánicas similares al tejido óseo:</b></p>	<p>Dependerán de la configuración del andamio, distribución de los poros, espesor de las interconexiones, rigidez del material, la elasticidad, absorción de</p>

	líquidos y sustancias del medio, estabilidad dimensional y la tasa de degradación química del andamio
<b>De fácil procesado, Modificable y reproducible y esterilizable:</b>	Para obtener distintas configuraciones en atención al tipo y tamaño del defecto óseo. Debe permitir la incorporación o el contenido de aditivos o agentes activos.

**Tabla 1.** Requerimientos en el diseño y elección de un andamio para regeneración ósea guiada  
Fuente: Suarez D.

Independientemente del biomaterial, la regeneración ósea guiada ha probado ser una técnica fiable tanto en experimentos en modelos animales como en clínicos. Se ha determinado que la neoformación ósea en dicha técnica deriva de dos posibles regiones, o bien se desarrolla a partir del periostio y de células derivadas de la región medular con potencial osteogénico; o la técnica lo que hace es facilitar el reclutamiento de células con potencial osteogénico de las poblaciones celulares de los Canales Haversianos y de Volkmann, y principalmente del endostio<sup>90</sup>.

La eficacia de las membranas en conjunción con la regeneración ósea y los tratamientos reconstructivos es probablemente el resultado de la combinación de distintos mecanismos mecánicos, celulares y moleculares<sup>6</sup>.

La posibilidad de que un defecto óseo cure por sí mismo, está en relación directa con su tamaño. La regeneración ósea espontánea se limita a defectos en los que exista una distancia ósea pequeña. El criterio para la utilización de membranas depende básicamente del tipo de defecto, es decir el número de paredes residuales y tamaño. En este sentido, los defectos de tamaño crítico no son capaces de regenerar espontáneamente; mientras que los de tamaño no crítico curan espontáneamente siempre que tengan intactas 4 paredes o cerrados<sup>99</sup>.

Un defecto con paredes óseas conservadas (defecto cerrado) es decir en el cual solo falta una pared, puede cicatrizar solo o bien realizando un relleno óseo, sin que requiera una membrana para estabilizar el coágulo o el relleno, siempre que el área anatómica donde se ubique disponga de suficiente soporte óseo como para garantizar

la estabilidad. No obstante, aún en defectos cerrados existen grandes posibilidades de invasión de componentes celulares (células epiteliales y conjuntivas) al defecto óseo, que interfieren con el proceso de regeneración<sup>99</sup>.

Mientras que en los defectos abiertos, en los cuales no existe 2 o más paredes óseas, no es posible mantener la estabilidad del contenido del defecto, pues es fácilmente desplazado por los micromovimientos de los tejidos blandos, en estos casos se requiere de biomateriales que ayuden en el proceso de regeneración<sup>99</sup>.

Para lograr este propósito los scaffolds o andamios se posicionan en un lugar importante, pues estos bioandamios han demostrado resultados clínica, radiográfica e histomorfológicamente altamente similares a los procesos fisiológicos de regeneración ósea<sup>90</sup>.

Estos dispositivos actúan de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento mientras que sintetizan su propia matriz extracelular, que proporciona un ambiente y arquitectura específicos del tejido y sirve como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento, entre otros<sup>90</sup>.

Existen muchas alternativas de materiales, técnicas de procesamiento y uso en combinación con otras técnicas de ingeniería de tejidos. Lo primordial es entender cuáles son los procesos biológicos, físicos y químicos y cuáles son sus mecanismos dominantes para poder hacer un adecuado desarrollo y selección de materiales y técnicas de fabricación de scaffolds para obtener implantes que sean sustitutos óseos útiles en aplicaciones clínicas<sup>90</sup>.

Hasta el momento se ha observado controversia en cuanto a las ventajas de usar una estrategia u otra para ganancia de tejidos y algunos autores sentencian el uso de los biomateriales, añadiéndole desventajas como la posibilidad de aumentar la tasa de morbilidad y necesidad de esperar un tiempo mayor para obtener resultados. Pero nuevamente se debe enfatizar que algunos biomateriales ciertamente poseen desventajas, pero casi en su totalidad son los no reabsorbibles y de origen sintético, o bien los de origen animal. Sin embargo, existen factores que pueden impedir la regeneración ósea, entre los que destacan: fallo en el aporte vascular, inestabilidad

mecánica, defectos de considerables magnitudes, invasión del foco por tejidos con alta tasa de proliferación, reacciones adversas por falta de biocompatibilidad. Finalmente no debe dejar de trabajarse en la producción de nuevas alternativas, pues lamentablemente todos los requisitos que debe poseer un biomaterial para que sea elegido al momento de practicar una ROG, han sido difíciles de obtener con las membranas disponibles en el mercado venezolano, puesto que no son totalmente biocompatibles, y las no reabsorbibles deben ser retiradas tiempo después de la cirugía<sup>8</sup>, actúan como un apósito pasivo, es decir, tampoco aportan ningún beneficio biológico adicional, sin mencionar el alto costo que implica su uso<sup>90</sup>.

Tomando en cuenta los principios biológicos fundamentales de la regeneración ósea, las técnicas quirúrgicas apropiadas, un diseño adecuado del biomaterial y una selección cuidadosa de los pacientes, la ingeniería de tejidos tiene el reto de desarrollar scaffolds, que superen las mencionadas desventajas, que cumplan la funcionalidad del hueso e imite sus propiedades y proporcione un soporte temporal que ayude al proceso de regeneración ósea<sup>90</sup>.

## 2.2.5 Tipos de defectos óseos

### 2.2.5.1 Clasificación de los defectos óseos

Los defectos óseos interdentarios se dividen en tres y se clasifican con base en número de paredes, profundidad y anchura. Constituyen el 35.2% de todos los defectos y el 62 % en defectos mandibulares, en el 85 % las crestas vestibulares y linguales son idénticas.

1. **De 2 a 3 paredes.** Es un defecto vertical, también denominado intraóseo. Con mayor frecuencia en caras mediales del segundo molar, terceros molares superiores e inferiores.
2. **Combinado.** Es cuando afecta más de tres paredes.
3. **De una sola pared.** También denominado hemiseptum; es cuando en la porción apical el número de paredes puede ser mayor que el de la porción oclusal. Pueden ser:
  - Superficiales angostos.

- Superficiales y anchos
- Angostos y profundos.
- Anchos<sup>99</sup>.

### **2.2.6 Fibrina**

La fibrina es la forma activa del fibrinógeno. En la existencia de trombina y  $Ca^{2+}$ , la cascada de la coagulación conduce a la conversión de fibrinógeno soluble en una red de fibrina insoluble, lo que estabiliza el tapón plaquetario<sup>100</sup>. El gel de fibrina polimerizado constituye la primera matriz cicatrizal de la herida<sup>101</sup>.

Esta molécula soluble está presente en el plasma y en los gránulos de las plaquetas, desempeña un papel importante en la agregación plaquetaria en la hemostasia<sup>101</sup>.

La fibrina rica en plaquetas (PRF) está en la forma de un gel de plaquetas y puede ser utilizado en combinación con los injertos óseos, que ofrece varias ventajas, incluida la promoción de la cicatrización de heridas, el crecimiento y la maduración ósea, la estabilización del injerto, el cierre de la herida y de la hemostasia y la mejora de las propiedades de manejo de materiales de injerto. El PRF también puede ser utilizado como una membrana. Los ensayos clínicos sugieren que la combinación de injertos óseos y los factores de crecimiento que figuran en el PRP y PRF pueden ser adecuados para mejorar la densidad ósea<sup>102</sup>.

### **2.2.7 Fibrina rica en plaquetas (PRF)**

#### *2.2.7.1 Generalidades*

Es un concentrado plaquetario de segunda generación, que forma una matriz natural de fibrina fuerte, muestra una arquitectura compleja en representación de una membrana con propiedades mecánicas únicas que hace que sea distinta de otros concentrados de plaquetas pues en su interior presenta los componentes de la sangre que son favorables para la regeneración ósea y tisular. Además el PRF es calificado como un biomaterial ideal por sus numerosos efectos positivos; brinda una proporción de factores de crecimiento durante un tiempo amplio (más de 7 días in vitro), en los sitios quirúrgicos luego de una intervención para que se estimule la regeneración ósea siendo una de las características fundamentales de este compuesto<sup>62</sup>. Llegando a ser superior

en relación a otros concentrados de plaquetas como el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) pues la sangre se extrae del mismo paciente sin la necesidad de anticoagulantes por lo que se centrifuga inmediatamente, lo que produce la formación natural de un conglomerado fuerte de plasma rico en fibrina justo en el centro del tubo (sin la adición de adyuvantes o factores desencadenantes), además se obtiene de forma rápida y económica (en menos de 20 minutos), permitiendo que el paciente pueda acceder a este tipo de tratamiento con más facilidad. Por lo tanto, PRF ha surgido como uno de los materiales regenerativos prometedores en el campo odontológico<sup>60</sup>.

Por otro lado, también existe el plasma rico en fibrina inyectable (i-PRF) que a diferencia de los otros concentrados mencionados anteriormente, se presenta de una forma más soluble y su característica principal es ser inyectable; sin embargo tiene las mismas características del PRF<sup>60</sup>.

#### 2.2.7.2 *Propiedades biológicas*

El PRF presentan en su composición los llamados intermediarios biológicos que son los factores de crecimiento pues estos se encargan de la proliferación, diferenciación y quimiotaxia celular, así como también de la formación de la matriz extracelular, dichos componentes tienen una gran importancia cuando se habla de regeneración de tejidos, los cuales son liberados al mismo tiempo que las plaquetas por lo tanto, mientras mayor cantidad de plaquetas se libere más factores de crecimiento existirán en el lugar de la herida, lo que dará paso a una cicatrización más rápida, siendo esta una de las ventajas del uso de concentrados plaquetarios (PC)<sup>60</sup>.

Dentro de los componentes del PRF se puede decir que presenta leucocitos, plaquetas, citoquinas, y las células madre dentro de una matriz de fibrina. Los leucocitos parecen influir fuertemente en la liberación de factores de crecimiento, la regulación inmune, actividades anti-infecciosas, y remodelación de la matriz durante la cicatrización<sup>60</sup>.

Se ha demostrado que el PRF libera lentamente, factor de crecimiento derivado de plaquetas-AB, factor de crecimiento transformante (TGF), que son específicos para la regeneración ósea y tisular lo que permite obtener mejores resultados. Este concentrado en comparación con otras modalidades de tratamiento presenta moléculas biológicamente activas que han sido exploradas en la regeneración periodontal además de la compatibilidad con injertos óseos autógenos, alogénos y materiales sintéticos<sup>60</sup>.

El plasma rico en Fibrina también estimula esta diferenciación osteoblástica, la angiogénesis se da por la influencia de los leucocitos. El PRF ha demostrado ser un buen material osteoconductor eficiente en elevaciones de seno siendo este al inicio un coagulo de sangre comprimido. La concentración tanto de fibrina como de factores de crecimiento mejora la curación natural de tejido óseo y tisular, durante la resorción fisiológica de la matriz de fibrina las citoquinas y leucocitos son liberadas poco a poco, esta liberación gradual de citoquinas parece jugar un papel modificador en los fenómenos inflamatorios en los tejidos que presentan una herida. El cierre primario de los tejidos blandos y la protección temprana del lugar de la lesión evita una posible infección, siendo una las funciones principales mecánicas del PRF. Este proceso simple y sencillo de realizar da como resultado el producto bioactivo más natural disponible en la actualidad<sup>60</sup>.

### 2.2.7.3 *Protocolo de obtención de PRF*

Varios autores citan el protocolo estándar, siendo Choukroun<sup>87</sup> el primero en obtener el PRF; su técnica original se realiza mediante la extracción de 10ml de sangre de la vena antecubital la mayor parte de las veces. Sin embargo, se pueden utilizar otras venas dependiendo del caso o si el paciente así lo prefiere, una vez obtenida la muestra se utiliza un kit de recolección en tubos vacutainer sean plásticos con recubierta de vidrio o tubos de ensayo, sin la necesidad de utilizar algún anticoagulante<sup>102</sup>, luego de prisa se coloca en la centrifugadora a 3.000 rpm durante 10 min luego a 2.700 rpm durante 12 min, no obstante diversos autores concluyen que en pacientes que utilicen anticoagulantes se aumentará el tiempo del proceso, se debe tomar en cuenta que cada tubo de sangre se convertirá en una membrana de PRF<sup>60,103</sup>, en los cuales se evidenciará distintas partes de los compuestos de la sangre procesada<sup>60</sup>.

Para evidenciar de mejor manera los componentes del coagulo de sangre sometido a la centrifugación en la parte media alta del tubo se observa el fibrinógeno que será posteriormente convertido en fibrina por la trombina móvil, estableciendo un coágulo que se encontrara en la mitad del tubo tras la centrifugación, en la parte superior se verifica la presencia de plasma y en la parte inferior del tubo los eritrocitos<sup>60</sup>. El plasma pobre en plaquetas se acumula en la parte superior y debe ser descartado. El PRF se disecciona aproximadamente 2mm por debajo de su conexión a la red de corpúsculos que se

encuentran por debajo para incluir las plaquetas restantes, estos corpúsculos están dispuestos para localizar el cruce entre el PRF y los hematíes<sup>100,102</sup>.

El producto resultante se compone de las siguientes tres capas<sup>102</sup>:

- La capa más consistente de Plasma Pobre en Plaquetas, acelular
- Coágulo de PRF en capa media
- Glóbulos rojos en la parte inferior.

#### 2.2.7.4 Efectos de la FRP en la cicatrización y regeneración de los tejidos

- **Angiogénesis**

La propiedad angiogénica de la matriz de la FRP se explica por la estructura tridimensional y por la acción simultánea de las citocinas atrapadas en las mallas. Así como la presencia de factores de crecimiento como son: el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>101</sup>.

- ✓ Fibrina y células madres: El coagulo de fibrina atrapa las células madres circulantes que llegan a la zona lesionada gracias a la neovascularización inicial. La FRP es usada como matriz de soporte, para la regeneración de defectos óseos<sup>101</sup>.
- ✓ Fibrina y tejido óseo: la fibrina es una matriz de soporte para los trasplantes de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), teniendo propiedades angiogénicas, hemostáticas y osteoconductoras. Considerado como un biomaterial de cicatrización y que permite la regeneración óptima<sup>101,104,105</sup>.

Así mismo, la rigidez de la matriz influye en la formación de capilares por las células endoteliales en respuesta a FGFb o la estimulación de VEGF<sup>101</sup>.

- **Acción inmunitaria**

La fibrina y los productos de degradación del fibrinógeno (FDP) estimulan la migración de neutrófilos, la fagocitosis y aumentan la expresión de los receptores CD11c/CD18.



La colonización de la herida por los macrófagos está controlada por la fibronectina a través de las propiedades químicas y físicas de la fibrina y por agentes quimiotácticos atrapados en el entrelazado de sus fibras<sup>106</sup>.

- **Recubrimiento de la herida**

La matriz de fibrina guía la cobertura de los tejidos dañados. La FRP, es un biomaterial favorable para el desarrollo de una microvascularización y capaz de orientar a la migración de células epiteliales de su superficie, protegiendo las heridas y acelerando la cicatrización<sup>104</sup>.

#### 2.2.7.5 *Ventajas de la FRP frente a otros preparados*

- Evita errores en la manipulación ya que no hay que hipocoagular la sangre, ni pipetear.
- Los procesos de centrifugación y coagulación se desarrollan de manera sucesiva sin ninguna manipulación.
- El resultado es independiente del manipulador.
- No se utiliza trombina bovina, ni cloruro de calcio.
- El coágulo de PRF atrapa el 100% de las plaquetas disponibles, por lo que su concentración es superior a la obtenida por cualquier otro procedimiento.<sup>101,104</sup>.
- El PRF como ventaja ante el PRP, es el de dispensar una concentración de factores de crecimiento por un tiempo más prolongado en las zonas intervenidas quirúrgicamente para estimular el proceso de regeneración, llegando a ser considerado como un biomaterial ideal que permite conservar la estructura ósea y gingival de la cavidad bucal<sup>60</sup>.
- Es una técnica básica realizada de forma rápida (en menos de 20 min) que precisa de centrifugación y el costo de su preparación es mínimo, lo que permite su uso en el consultorio<sup>60</sup>.

#### 2.2.7.6 *Aplicaciones de la PRF en odontología*

- Alveolos post extracción tanto en exodoncias simples como complejas<sup>60,107</sup>.

- En exodoncias múltiples, para conservar la altura del reborde alveolar<sup>107</sup>.
- Preparación de membranas<sup>104</sup>.
- Colocación de implantes rellenando el defecto<sup>60,107</sup>.
- En cirugías preprotésicas para la reconstrucción de rebordes alveolares atróficos<sup>101</sup>.
- Elevación del seno maxilar y combinación con injertos<sup>60,101</sup>.
- Comunicaciones y fistulas bucosinusales.
- Defectos óseos generados por la exodoncia de caninos o terceros molares, en defectos óseos periapicales luego de una apicectomía y en reconstrucción de grandes defectos óseos post cirugía oncológica.
- Patologías en relleno de cavidades quísticas postquistectomía.
- En injertos óseos en bloque, para rellenar la zona donante estimulando su regeneración<sup>108</sup>.
- Posterior al reposicionamiento de fracturas, en cirugía ortognática.
- En trasplantes dentarios<sup>101</sup>.
- En pacientes bajo terapia de bifosfonatos<sup>109</sup>.
- En defectos periodontales y procesos regenerativos óseos<sup>60</sup>.

### **2.2.8 La fibrina rica en plaquetas inyectable (i-PRF)**

Se desarrolló por primera vez en 2014 por Choukron<sup>108</sup>. Es un sistema de concentración de sangre totalmente autóloga que no requiere el uso de anticoagulantes externos<sup>87</sup>, se ha utilizado ampliamente con múltiples propósitos médicos y es un complemento valioso para la regeneración de tejidos dañados en procedimientos quirúrgicos. Las sustancias bioactivas enriquecidas en i-PRF son responsables de acelerar el proceso de curación de heridas<sup>110</sup>.

Para eliminar la necesidad de anticoagulantes externos y así generar un sistema efectivo de sangre fluida y autóloga, se desarrollaron tubos de plástico específicos para recoger la sangre; a diferencia de los tubos de vidrio utilizados en matrices de PRF sólidas, las características de la superficie plástica no activan la cascada de coagulación

durante la centrifugación. De este modo, de acuerdo con el concepto de centrifugación a baja velocidad (LSCC), la reducción adicional del RCF a 60 g y el uso de tubos de plástico permitió la introducción de una matriz PRF inyectable (i-PRF).

El análisis comparativo del número total de células en i-PRF y otros sistemas de concentrados de sangre líquida como PRGF y PRP mostraron un número significativamente mayor de plaquetas, leucocitos, monocitos y granulocitos en i-PRF que en PRP y PRGF. Sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre PRP y PRGF. Estas observaciones resaltan que al usar el LSCC, las matrices sólidas basadas en PRF podrían mejorarse en PRF inyectable altamente rico en células con un potencial regenerativo mejorado<sup>87</sup>.

La introducción de i-PRF ha ampliado los campos de la aplicación de PRF en varias indicaciones médicas y quirúrgicas, especialmente en combinación con la medicina regenerativa basada en biomateriales<sup>87</sup>.

El acondicionamiento de los biomateriales utilizando i-PRF en términos de funcionalización y biologización de biomateriales, independientemente de su origen, proporciona los componentes regenerativos concentrados propios del paciente para acelerar la regeneración. Por ellos, los biomateriales como los materiales sustitutos de hueso, se pueden combinar fácilmente con el fluido i-PRF<sup>87</sup>.

Además, el LSCC condujo al desarrollo de una estructura de coágulo más porosa para servir como andamio y depósito de factores de crecimiento, facilitando el proceso de regeneración<sup>87</sup>.

#### 2.2.8.1 *Método de obtención del i-prf*

Para la obtención del i-PRF, se realiza la recolección de sangre utilizando tubos de 9 ml, sin adición de ningún aditivo. La sangre utilizada para la confección del i-PRF es donada por los propios pacientes. Se pueden usar 2 tubos de ensayo, los cuales deben ser colocados en la centrífuga, utilizando un tubo lleno de agua para mantener el equilibrio para el centrifugado, y el otro con la sangre del paciente el cual se debe centrifugar durante 2 minutos, con velocidad de 1300rpm aproximadamente. Al finalizar dicha centrifugación, la sangre se separa en una fase superior amarilla naranja (i-PRF) y en una fase inferior roja (fracción de glóbulos rojos) (fig.8). Seguidamente,

los tubos deben ser abiertos de forma cuidadosa, para no generar la homogeneización del material, y el i-PRF se recogerá utilizando una jeringa de 20 ml con una aguja hipodérmica de 18G y se recolectara el i-PRF de los tubos obteniendo aproximadamente 5 ml <sup>62</sup> (fig.9). El i-PRF recolectado mantendrá su fase fluida hasta 10 a 15 minutos después de la centrifugación<sup>87</sup>.



**Figura 8. Fases del I-Prf.** Sobrenadante líquido de fibrina prepolimerizada y precipitado de glóbulos rojos al fondo del tubo. Extracción del **I-Prf**. Fuente propia.

## 2.2.9 Hormona de crecimiento

### 2.2.9.1 Generalidades

La hormona de crecimiento (somatotropina, GH, del inglés growth hormone), es una hormona peptídica de 191 aminoácidos que se secreta en la hipófisis o glándula pituitaria, tiene un peso molecular de 22.005 Kd. La GH estimula el crecimiento de todos los tejidos del organismo, incluyendo cartílago y hueso. Por un lado, la GH junto con los esteroides gonadales, estimula la proliferación y diferenciación de los condrocitos del cartílago epifisario. Respecto al hueso, es capaz de estimular la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, pero también de los osteoclastos. Existen receptores de GH en los condrocitos, osteoblastos y osteoclastos. Pero se sabe que también puede actuar de forma indirecta, a través de la síntesis de IGF-I<sup>111</sup>.

### 2.2.9.2 *Biosíntesis y secreción*

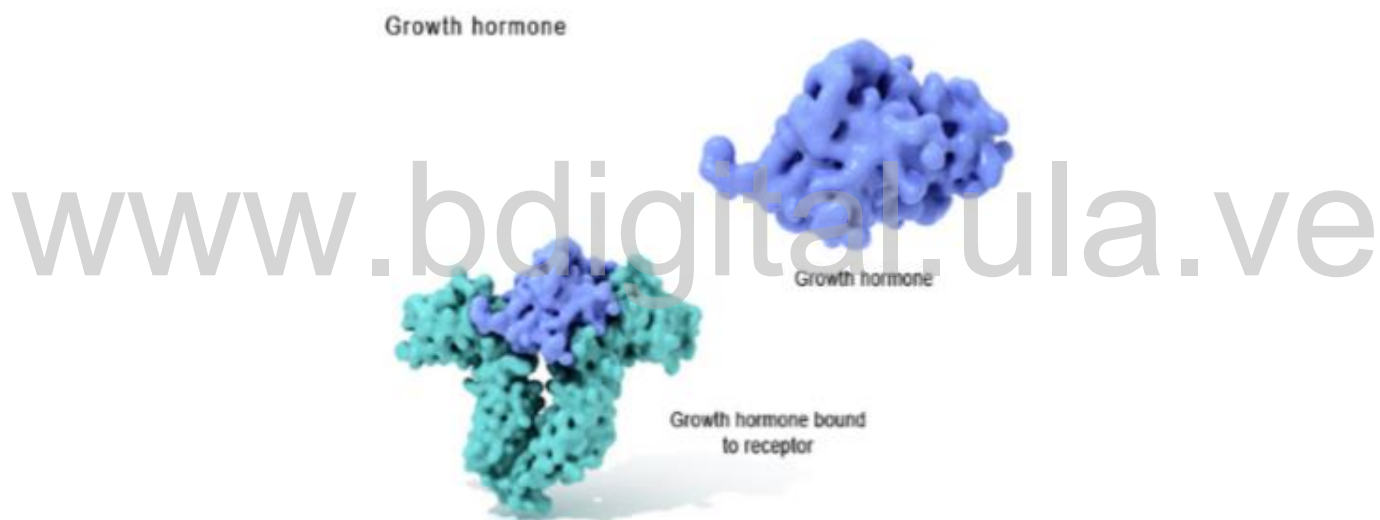
La GH se origina en la hipófisis o glándula pituitaria. La hipófisis es una pequeña glándula situada en la silla turca (cavidad ósea en la base del cráneo) y unida al hipotálamo mediante el tallo hipofisiario. La hipófisis se divide en dos partes el lóbulo anterior o adenohipófisis y el lóbulo posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis secreta seis hormonas peptídicas necesarias (hormona de crecimiento, corticotropina, tirotropina, prolactina, hormona estimulante de los folículos y la hormona luteinizante) y otras menos esenciales, mientras que la neurohipófisis sintetiza dos hormonas peptídicas importantes (hormona antidiurética y la oxitocina).

Es sintetizada, almacenada y secretada al torrente sanguíneo bajo el estímulo de la Somatoliberina u hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) la cual es un polipeptido formada por 44 aminoácidos. Casi toda la secreción de la hipófisis está controlada por señales hormonales o nerviosas procedentes del hipotálamo y terminan en la neurohipófisis. La GH se segrega en pulsos cada dos horas, la mayor descarga se lleva a cabo durante el sueño y disminuye durante la vigilia y tiene una vida media de 20 minutos. En niños y adolescentes la cantidad de GH circulando en la sangre es elevada, en adultos es menor. Es degradada por enzimas de la sangre y es rápidamente excretada por los riñones y el hígado, permaneciendo en la sangre por un corto período de tiempo<sup>112</sup>.

### 2.2.9.3 *Distribución*

La GH pertenece al grupo de hormonas peptídicas, esto quiere decir, que puede circular de forma libre en el plasma, aunque a diferencia del resto, puede circular también unida a proteínas plasmáticas y así aumentar su vida media). Para llevar a cabo sus efectos, es necesario que la GH se una a un receptor específico GHR (Receptor de la hormona de crecimiento. Esta unión desencadena una cascada de transducción, que es la responsable de la acción de la GH en los tejidos periféricos. El GHR, expresado por condrocitos y osteoblastos es una proteína compuesta por un dominio extracelular, otro transmembrana y un tercero intracelular, situada de manera ubicua en la membrana de las células de casi todos los tejidos, sobre todo en hígado, tejido adiposo, corazón, riñones, intestino, pulmón, páncreas, cartílago y músculo esquelético. Cuando GHR se

activa se produce un cambio conformacional que induce a la activación del sistema enzimático Janus Kinasa II (JAK2). Esto conduce a la autofosforilación y a la fosforilación a las proteínas STAT que actúan también como factores de transcripción uniéndose directamente a secuencias de ADN que producen como resultado, una regulación positiva de la expresión de IGF-I. El GHR es un receptor de citoquinas clase 1. Se ha observado que cada molécula de GH se uniría a dos moléculas de receptor y para que se produzcan los efectos biológicos, debe existir una cantidad adecuada de GH que permita la dimerización de los receptores. Y, a diferencia de otras hormonas peptídicas, la GH tras la unión a GHR puede penetrar en el interior de la célula llegando hasta el núcleo intacta o como producto degradado por los lisosomas<sup>111</sup>.



**Figura 9.** Gh y gh-r tomada de U.S national library of medicine

#### 2.2.9.4 Eje GH/IGF

La GH se secreta de forma pulsátil y actúa de forma directa o indirecta sobre los tejidos periféricos. Para ello estimula la síntesis y secreción de IGF-I fundamentalmente en el hígado. Además, la GH puede actuar directamente sobre los condrocitos, de tal manera que el tejido condral también estaría involucrado en la síntesis de IGF-I. La GH es capaz de estimular directamente a los condrocitos del cartílago de conjunción para producir el crecimiento del hueso. Gran parte de las

acciones de la GH están mediadas por IGF-I, el cual ha sido reconocido como regulador clave en el crecimiento, desarrollo y metabolismo esquelético<sup>111</sup>.

#### 2.2.9.5 *Inhibición de la GH:*

Está controlada por las hormonas (o factores) de liberación o de inhibición hipotalámicas. Estas se sintetizan en el hipotálamo y pasan a la adenohipófisis a través de minúsculos vasos sanguíneos denominados vasos porta hipotálamo-hipofisarios. Dicha inhibición se produce por el estímulo de la Somatostatina u hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (GHIH) la cual es polipéptido de 14 aminoácidos.<sup>10</sup>

#### 2.2.9.6 *Excreción de la GH*

La GH circulante se elimina de la sangre a través de una degradación mediada por receptores, principalmente en el hígado y en el riñón<sup>113</sup>.

#### 2.2.9.7 *Farmacodinamia*

Desde el punto de vista bioquímico se ha comprobado que en el cartílago y el hueso la GH incrementa la incorporación de  $SO^4$  (sulfato) en los proteoglicanos, la incorporación de la timidina en el ADN condrocítico y la conversión de prolina en hidroxiprolina en el colágeno. El que estos efectos no se observasen in vitro hizo suponer que la hormona no actúa directamente, sino que lo hace a través de la somatomedina (mediador de la hormona somatotropa) también llamada IGF (insulin-like growth factor).

La acción de la GH sobre el crecimiento óseo longitudinal, queda así subordinado a la fabricación periférica, en el hígado, de un factor mediador responsable último de esta acción, estableciéndose un eje GH-somatomedina-crecimiento.

Existe un sistema mucho más complejo, según el cual la propia hormona sería capaz de actuar también directamente sobre el cartílago de crecimiento, Gh y somatomedina estimularían de esta forma diferentes poblaciones de condrocitos y la GH induciría directamente la diferenciación de estas células, haciendo que expresen el gen codificador de somatomedina. Los condrocitos diferenciados comenzarían a producir somatomedina y esta desencadenaría la proliferación clonal y maduración de nuevos condrocitos por mecanismos paracrinos.

De esta forma de secuencia ordenada de acontecimientos que tiene lugar en la maduración celular en el cartílago, y que llevan el crecimiento longitudinal del hueso, la Gh sería la primera desencadenante y la somatomedina el segundo<sup>43</sup>.

La principal vía de administración de la GH es la subcutánea y la principal desventaja es su vida media corta y la nefrotoxicidad. Sin embargo se ha investigado otras vías de administración, como, por ejemplo, implantes de láminas biodegradables y la aplicación tópica de rhGH en forma de polvo liofilizado<sup>112</sup>.

#### 2.2.9.8 *Aplicación tópica de rhGH*

Lo más común es que esta sea la vía de administración debido a que en administración sistémica requiere la necesidad de mantener una vigilancia debido a la posibilidad de desarrollar cáncer, enfermedades cardiovasculares y alteración en el metabolismo de carbohidrato, partiendo de lo anteriormente descrito se dice que para garantizar dicha seguridad esta no debe pasar de los 0,35 mg/k a la semana. Existen muy pocos estudios que permiten analizar el intervalo de tiempo que debe transcurrir entre en el control completo de una neoplasia maligna y el inicio del tratamiento con HChr tanto en niños como en adultos. De este modo estudios de experimentación animal han demostrado que exposición a dosis supra-fisiológicas de rhGH favorecen ciertos cánceres, mientras que animales hipofisectomizados están protegidos frente a diferentes carcinógenos. Así mismo, en humanos existe un aumento de riesgo de cáncer en algunos polimorfismos del eje GH/IGF-1. En la presente investigación se empleó una dosis única de 1UI (unidades internacionales) de GH el cual es equivalente a 0,33 mg, en relación a la dosis máxima anteriormente mencionada (0,35 mg/k) dicha administración no generó algún efecto adverso<sup>114</sup>.

#### 2.2.9.9 *Efectos sobre el hueso*

Al disponer de receptores en prácticamente todas las células del organismo, la GH posee gran cantidad de funciones biológicas a nivel metabólico, cardiovascular, a nivel del sistema inmunitario, efectos en la proliferación celular, efectos sobre la masa muscular...etc. A nivel óseo, la GH estimula la proliferación de osteoblastos (Kassem et al, 1993), siendo necesaria la intervención de IGF-I y actuando sobre él de manera



directa o indirecta. IGF-I estimula la función del osteoblasto maduro. Además, estimula la expresión de proteínas morfogénicas óseas, importantes para la diferenciación de osteoblastos y formación de hueso (Canalis, Economides y Gazzero, 2003) y estimula la carboxilación de la osteocalcina, marcador de la función de los osteoblastos.

En el proceso de remodelado, existe un equilibrio entre formación y reabsorción gracias a que los osteoblastos rellenan con matriz neoformada los espacios reabsorbidos.

Otra función de la GH es la de estimular el crecimiento longitudinal del hueso de manera directa tras actuar sobre los condrocitos de la capa germinal de la placa epifisaria; o de manera indirecta mediado por IGF-I en las etapas posteriores de maduración. Mientras que IGF-II participaría en el crecimiento longitudinal del hueso durante el periodo embrionario, es IGF-I el responsable de ello durante el crecimiento (Baker et al, 1993; Liu et al, 1993). Sin embargo, el sistema GH/IGF también puede contribuir a la pérdida ósea debido a su disminución progresiva con la edad debido a una serie de factores asociados al envejecimiento como la disminución de esteroides sexuales, descenso de la actividad física, falta de sueño, nutrición inadecuada y aumento de la regulación negativa de GH e IGF<sup>111</sup>.

#### *2.2.9.10 Acciones biológicas de la hormona de crecimiento*

La GH cumple distintas acciones en el organismo. La misma estimula el crecimiento somático y actúa en el metabolismo intermediario estimulando el anabolismo proteico y la lipólisis. Los efectos anabolizantes de la GH ocurren en tejidos muy variados como hueso, cartílago, músculo, hígado y una serie de vísceras y glándulas. A nivel muscular, se observa un incremento de transporte de aminoácidos al interior de la célula, que aparece rápidamente y es bloqueable por inhibidores de la síntesis proteica. Unas horas más tarde hay un claro aumento de ARN ribosómico, de la síntesis de ADN y neosíntesis proteica. Estos mismos fenómenos ocurren en el hígado, donde la GH promueve la fabricación de un gran número de proteínas (entre ellas las somatomedinas/IGF-I). Además, la GH desempeña un papel en la regulación de niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, disminuyendo los primeros e incrementando los segundos. Con la destrucción de los triglicéridos y oxidación de los

ácidos grasos se consigue la energía necesaria para la fabricación de proteínas. Asimismo, la GH influye sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos. Estimula la expresión del gen de la insulina. Aunque la GH estimula el depósito de proteínas y el crecimiento de casi todos los tejidos del organismo, su efecto más evidente consiste en el aumento del crecimiento del esqueleto. Según Ohlsson C et al, la GH es una de las sustancias más importante en la regulación del crecimiento y remodelación del tejido óseo in vivo<sup>10</sup>.

Existen dos mecanismos fundamentales que explican el crecimiento óseo: En primer lugar, en respuesta a la estimulación a la GH, la longitud de los huesos largos aumenta en los cartílagos epifisarios, donde las epífisis de los extremos del hueso están separadas de las diáfisis. Este crecimiento produce el depósito de cartílago nuevo, seguido de su conversión en hueso nuevo, como consecuencia las diáfisis se separan cada vez más de las epífisis. Al mismo tiempo el cartílago epifisario va desapareciendo, de modo que al final de la adolescencia ya no queda cartílago epifisario adicional que permita seguir creciendo los huesos largos, como consecuencia se produce la fusión ósea entre la diáfisis y la epífisis en cada uno de los extremos y el crecimiento longitudinal de los huesos largos se detiene. En el segundo mecanismo del crecimiento óseo, los osteoblastos del periostio depositan hueso nuevo en la superficie del viejo, al mismo tiempo los osteoclastos eliminan hueso viejo. Cuando el ritmo de aposición supera al de resorción, el grosor del hueso aumenta. En este proceso la GH tiene un papel fundamental. Esta hormona posee un potente efecto estimulante de los osteoblastos, en consecuencia, el grosor de los huesos puede seguir aumentando durante toda la vida bajo los efectos de la hormona de crecimiento, éste es el caso, sobre todo, de los huesos membranosos<sup>10</sup>.

#### 2.2.9.11 Somatomedinas (IGF)

La GH actúa sobre el hígado para formar pequeñas proteínas denominadas somatomedinas que, a su vez, ejercen un potente efecto estimulador de todos los aspectos del crecimiento óseo.

Las somatomedinas se producen en muchos tejidos en respuesta a la GH. El termino somatomedina se refiere a su actividad de mediador del crecimiento somático.

Muchos de estos efectos de las somatomedinas sobre el crecimiento se asemejan a los de la insulina. Por consiguiente, las somatomedinas reciben también el nombre de factores de crecimiento pseudoinsulínicos (IGF- insulin-like growth factors). Se han aislado al menos cuatro somatomedinas, pero la más importante de ellas es la somatomedina C (denominada también factor de crecimiento parecido a la insulina I o IGF-I). El peso molecular de la somatomedina C oscila en torno de 7500 y su concentración plasmática guarda una estrecha relación con la velocidad de secreción de la GH. Estructuralmente, el IGF-I (Somatomedina C), es un péptido compuesto por 70 aminoácidos que representa una secuencia aminoacídica similar a la proinsulina. El IGF-II (Somatomedina A) está compuesto por 67 aminoácidos y es también muy similar a la proinsulina. Los IGF se hallan en gran concentración en la matriz osteoide, circulan unidos a una serie de grandes proteínas ligadoras en el hígado, que a su vez pueden ejercer efectos estimulantes o inhibidores sobre el hueso. Asimismo, los IGF están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Por otro lado, media la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo. Las somatomedinas sirven de intermediario en las respuestas características a la GH del cartílago, el hueso, el músculo, el tejido adiposo, los fibroblastos y células tumorales in vitro. Los individuos que carecen de capacidad de producir IGFs presentan un retraso del crecimiento, a pesar de sus concentraciones elevadas de GH. La GH es capaz de estimular la proliferación y diferenciación de osteoblastos, que presentan receptores para la hormona, aumentando la incorporación de H3 timidina dentro de las células y también otros marcadores bioquímicos del fenotipo osteogénico, tales como péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I, osteocalcina y fosfatasa alcalina. Los IGFs, a su vez, incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. La GH se une de forma muy laxa a las proteínas plasmáticas de la sangre y, por tanto, se libera con rapidez desde la sangre a los tejidos (su vida media en la sangre es inferior a 20 minutos). Por el contrario, la somatomedina C se une con fuerza a una proteína transportadora sanguínea que, al igual que la somatomedina C, se genera

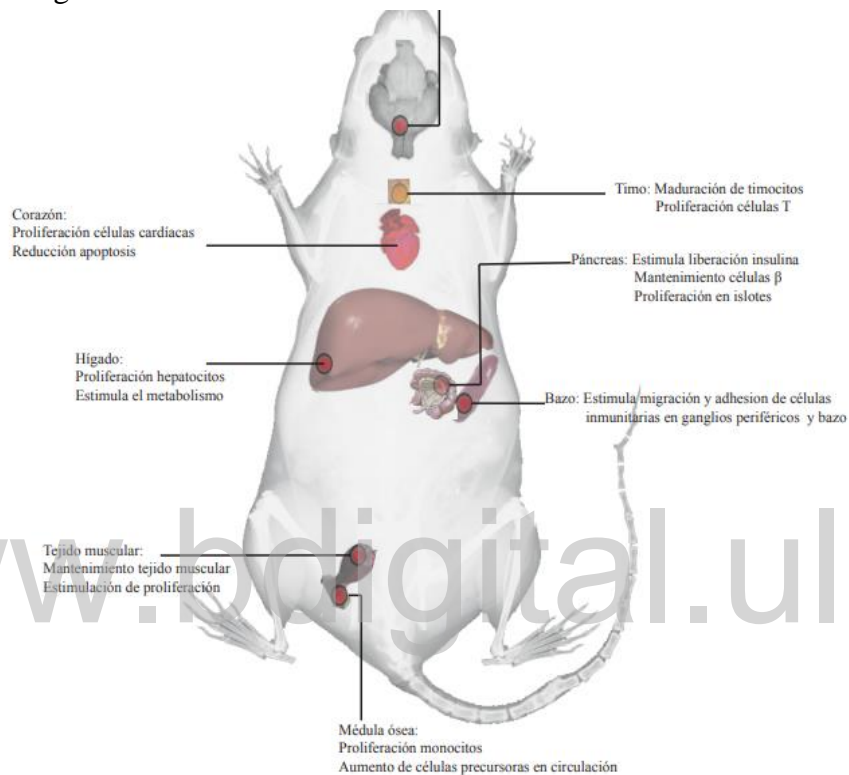
en respuesta a la GH. Como consecuencia el paso de la somatomedina C de la sangre a los tejidos es lento y su vida media es de unas 20 horas. El receptor de la GH humana (GH-R) es una proteína transmembrana de 620 aminoácidos codificada por un gen ubicado en el cromosoma 5. A diferencia de lo que ocurre con la unión GH-GHBP-I (proteína transportadora), la unión de la hormona a su receptor es de 1:2, es decir, una molécula de la hormona debe unirse a dos moléculas del receptor para poder originar un complejo más activo, lo que está en consonancia con la existencia en la molécula de GH de dos sitios activos de unión<sup>10</sup>.

#### *2.2.9.12 Hormona de crecimiento en rata*

GH-Efectos sobre el sistema inmune: La hormona de crecimiento ha demostrado ser un modulador en la actividad fisiológica del timo repercutiendo directamente en la actividad del sistema inmunológico, como se evidencia en ratones deficientes para GH donde se ha visto un déficit de células inmunes en timo y en circulación periférica. En estudios in vitro la GH aumenta la proliferación de células T, o la producción de citoquinas liberadas por monocitos.

La GH es producida en la adenohipófisis por células especializadas llamadas células somatotróficas. Su producción sigue pautas circadianas y aumenta en horas nocturnas, presentando pautas dependientes de género, más discontinuas y regulares en los machos, y más bajas, continuas e irregulares en las hembras. Además, la secreción en picos de sierra se frena durante el embarazo cuando la GH es sustituida por una variante placentaria. Los órganos que presentan un mayor número de receptores de la hormona de crecimiento (GHR) son el hígado y el tejido adiposo. Gran parte de la actividad de esta hormona está relacionada con el incremento de la síntesis de aminoácidos dentro de las células, el incremento de la síntesis de proteínas y la lipólisis (fig. 11).

La GH estimula la producción de su principal mediador, el factor de crecimiento insulina tipo I (IGF-1), muy similar en estructura molecular a la insulina. Aunque IGF-I se expresa principalmente en el hígado, su producción es muy ubicua, incluso se ha descrito su producción por células del sistema inmune como, por ejemplo, los macrófagos<sup>115</sup>.



**Figura 10.**

Los ratones transgénicos que expresan hormona de crecimiento sufren diversas alteraciones patológicas que frecuentemente afectan, entre otros órganos, al hígado. Además de la hepatomegalia que se observa macroscópicamente, suele describirse una hipertrofia hepatocelular con aumento del tamaño de células y núcleos, que presentan proliferación del retículo endoplásmico y pseudoinclusiones nucleares. Las lesiones se agravan a medida que envejecen los animales. A los cinco meses de edad se aprecian

algunos megahepatocitos cuyo núcleo alcanza hasta 5 veces el contenido de DNA de un hepatocito normal. Presentan además una ligera esclerosis en hígado. <sup>116</sup>

Por otro lado, estudios realizados en ratas han demostrado que la administración exógena de GH de forma subcutánea a dosis de 2 mg/kg/día (en dos inyecciones diarias) durante 10 semanas, tiene la capacidad de aumentar el área ósea, el área cortical y el área ósea trabecular, aunque solo las dos primeras de manera estadísticamente significativa. Es decir, que la GH tendría más efecto sobre el hueso cortical que sobre el hueso trabecular.<sup>21,111</sup>

### **2.2.1 La tibia de la rata Wistar como modelo**

El modelo en tibia de rata Wistar es económico, de fácil manipulación, bajo costo en mantenimiento y no requiere de material de osteosíntesis. En este modelo al crear un defecto no crítico en la tibia de la rata se tiene un mejor control del sitio de la lesión, ya que al no crear una fractura completa no se sufre de desestabilización o consolidación viciosa (curación de una fractura con alineamiento anatómico incorrecto, que puede derivar en deformidades o mal funcionamiento). Tampoco es necesario utilizar material de osteosíntesis ya que no se afecta la estabilidad ósea y con esto evitamos la presencia de un cuerpo extraño que puede causar alteraciones en los procesos biológicos que se requieren para que una fractura consolide.

El aumento de peso de todos los animales fue semejante al final del experimento, esto demuestra un control de la alimentación (libre demanda) y la respuesta del animal a la cirugía; durante cirugías invasivas el peso del animal puede disminuir y las condiciones generales de salud pueden verse afectadas, derivando en un retraso en la recuperación de los animales. Ya que la cirugía efectuada es de mínima invasión, el defecto es de mínima invasión, el defecto es de tamaño no crítico y el miembro operado no necesita ser estabilizado, el animal después de recuperarse de la cirugía consigue apoyar la extremidad, camina, se alimenta y toma agua, todos estos factores favorece su recuperación.

Por otro lado, debido a que existe variabilidad en las dimensiones del canal medular de cada animal, el grado de inestabilidad puede variar en esta proporción

cuando se utiliza material de osteosíntesis, en este modelo al no ser afectada la estabilidad ósea y no necesitar de material extraño al hueso, la reparación del defecto no se afecta por parámetros externos, no se induce una respuesta a ellos y de esta manera las variaciones que pueden existir en el canal afectan de forma mínima durante el curso de la reparación. Esto también es minimizado al tener un rango de peso inicial, cepa (Wistar) y sexo (machos) de los animales lo que reduce significativamente el impacto sobre el hueso al ser controlados, ya que se sabe que los parámetros biomecánicos y biológicos cambian al variar estas condiciones.

Los modelos animales son indispensables para el estudio de nuevos materiales y estrategias de reparación ósea, en particular los modelos en rata por ser de fácil manejo, sin la interferencia de material de osteosíntesis y por ser adecuado para diferenciar etapas durante el proceso de reparación ósea desde el punto de vista biomecánico.

Este modelo de defecto óseo, tiene amplias posibilidades de aplicación para el estudio de nuevos materiales combinación de materiales, cultivos celulares y/o entramados, para estimular la reparación ósea en un tiempo menor al del curso normal, ya sea para cirugía ortopédica, traumatología, cirugía plástica y odontología, ya que es económico, de fácil manejo y análisis.

Este tipo de modelos permite caracterizar el comportamiento del hueso, en este caso para un defecto óseo no crítico y bajo ciertas condiciones los datos obtenidos pueden ser útiles en modelos de simulación para realizar análisis con modelos computacionales<sup>88</sup>.

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

A continuación, se establecen los detalles metodológicos de este estudio, su tipo y diseño investigativo, el sistema de variables, la muestra a considerar, los aspectos bioéticos, técnicas de recolección y análisis de datos, el instrumental necesario, los procedimientos llevados a cabo durante la realización del experimento.

#### **3.1 Tipo y diseño de investigación**

##### **3.1.1 Tipo**

Se clasificó según la taxonomía de Hurtado<sup>117</sup>. La investigación es de tipo confirmatoria ya que requiere de una explicación previa o una serie de supuestos o hipótesis, los cuales se desean confirmar. Su objetivo es verificar una o más hipótesis derivadas de una teoría, a partir de la experiencia directa. La experiencia puede decir si una hipótesis es aceptable, pero sólo temporalmente, pues el conocimiento está sujeto a constante revisión. En la presente investigación se estudió si la hormona de crecimiento combinada con la fibrina inyectable logró ser efectiva para la regeneración ósea guiada, mediante la realización de un experimento que verificó si la hipótesis era aceptable.

##### **3.1.2 Diseño**

El diseño es de *laboratorio* debido a que la información se recogió de un ambiente artificial; con respecto a la línea de tiempo, es *evolutivo contemporáneo* ya que la información se obtuvo de un evento actual y además se estudió el evento en su proceso de cambio a lo largo del tiempo, por ello requirió hacer mediciones repetidas; y *experimental* porque el investigador interviene sobre todas las variables. El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del BIOULA, se evaluaron los



resultados a las 3, 6 y 9 semanas, controlando las variables independientes y las variables extrañas<sup>117</sup>.

### 3.2 Ejemplares biológicos

Los ejemplares biológicos estuvieron constituidos por 23 ratas de la cepa BIOU: Wistar con un peso comprendido entre 400 y 420 gr cada uno, aportados por el Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA).

Tomando en cuenta los criterios éticos establecidos por el bioterio, se debe emplear el menor número posible de animales; por lo cual, la cantidad usada en la investigación representa la mínima necesaria para el análisis estadístico.

### 3.3 Sistemas de variables

Variables independientes: Hormona de crecimiento y fibrina.

Variable dependiente: Regeneración ósea guiada.

### 3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

#### 3.4.1 Técnica de recolección de datos

La técnica de recolección de datos fue la observación asistida técnicamente ya que se usó el negatoscopio para la evaluación de las radiografías y el microscopio para observar las muestras obtenidas.

#### 3.4.2 Instrumentos de la recolección de datos

Se recolectaron los datos en dos fichas de evaluación: radiográfica e histológica. (Anexo A y B)

##### 3.4.2.1 Evaluación radiográfica cualitativa

Para la observación radiográfica cualitativa, se realizó una lista de cotejo que consta de 04 niveles la cual se aplicó a cada muestra<sup>118</sup>, y estos son:

**Nivel 0: Defecto radiolúcido:** sin variación radiográfica del defecto.

**Nivel 1: Relleno óseo limitado:** el defecto óseo se mostró con imágenes radiopacas en los márgenes del defecto.

**Nivel 2: Relleno óseo parcial:** el defecto óseo fue parcialmente radiopaco, con regiones de radiolucidez y radiopacidad, que indicaron la formación de hueso nuevo desde los márgenes del defecto sin establecer una continuidad.

**Nivel 3: Relleno óseo completo:** el defecto óseo fue radiopaco en su totalidad.

#### 3.4.2.2 Evaluación radiográfica cuantitativa

En este parámetro radiográfico se tomó en cuenta el área de extensión de los defectos óseos al inicio y al final del experimento. Para ello se midió la longitud por el ancho del defecto óseo, se multiplicaron ambas mediciones para hallar el área expresada en milímetros cuadrados<sup>90</sup>. (Figura 11)

**Área del defecto** (Radiolucidez total) = Longitud x ancho

Luego de obtener esta medida se procede a realizar la siguiente regla de tres para así obtener el porcentaje de regeneración alcanzada para cada grupo de estudio.

$$X = \frac{\text{extensión de la radiopacidad} * 100\%}{\text{Área inicial del defecto K (1cm de longitud x 0,5 cm de ancho)}}$$

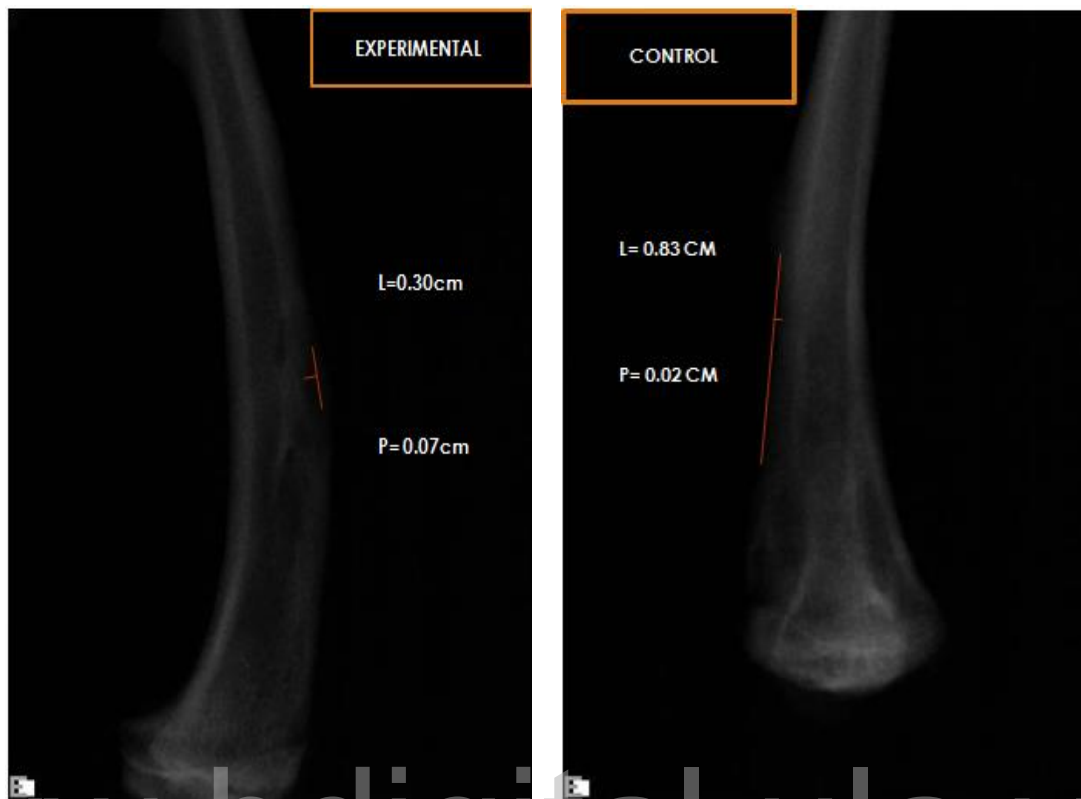


Figura 11. Radiografías de una muestra experimental y una muestra control, a las que se les realizó la medición de la radiolucidez presente, para así obtener el área expresada en milímetros cuadrados.

#### 3.4.2.3 Evaluación histológica

Se utilizó una lista de cotejo constituida por (04) niveles, para medir y determinar el porcentaje de regeneración ósea en los cortes histológicos<sup>119</sup>.

- **Nivel I (25%):** Predominio de tejido de granulación y presencia de infiltrado inflamatorio.
- **Nivel II (50%):** Presencia de tejido de granulación, presencia de osteoblastos y zonas de formación de osteoide.
- **Nivel III (75%):** Predominio de osteoblastos, osteoide llena gran parte del defecto creado, focos de mineralización del osteoide (trabéculas osiformes).

- **Nivel IV (100%):** Mineralización de osteoide en el defecto, presencia de hueso maduro.

### **3.5 Materiales e instrumental**

#### **3.5.1 Materiales para la experiencia quirúrgica:**

- Marcadores de color rojo y negro para el marcaje de los animales
- Frascos de vidrios estériles como contenedores
- Campos odontológicos impermeables para la mesa de trabajo
- Papel absorbente
- Jeringas de insulina, debidamente identificadas con el nombre de su contenido
- Jabón yodado para limpiar el área antes de la depilación
- Solución fisiológica al 0.9% para el lavado del defecto
- Gasas estériles
- Agua oxigenada para limpiar el área una vez suturada
- Sutura reabsorbible Vicryl® 4-0 para el plano muscular
- Sutura Nylon 3-0 para el plano epitelial
- Ketamina (100 mg/kg), en asociación con Xilacina (5 mg/kg) por cada animal (Sedación)
- Cartuchos de lidocaína (Rapicaine) al 2% con adrenalina al 1:100.000 (Anestésico local)
- Meloxicam 1 mg/kg de peso para cada animal
- Lincomicina 0,015 ml aproximadamente para cada animal
- Hormona de crecimiento en polvo liofilizado.
- i-PRF (material autólogo-aproximadamente 5 cc)
- Tubos de ensayo tapa roja (sin anticoagulante).
- Gerdex® para la desinfección del instrumental y equipos en la sesión quirúrgica, además de la esterilización en autoclave.

#### **3.5.2 Insumos para la eutanasia de los animales**

- Enflurano SP al 100%

### **3.5.3 Insumos para el procesamiento histológico de las muestras**

- Formol al 10%.
- Ácido nítrico al 2%
- Hoja de Bisturí N°10
- Hematoxilina y eosina
- Alcohol isopropílico al 99%
- Xilol
- Parafina líquida para conformar bloques
- Medio de montaje
- Ácido clorhídrico más formol al 10%
- Portaobjetos y cubreobjetos

### **3.5.4 Instrumentos para la experiencia quirúrgica**

- Hojas de bisturí N°15
- Mango de bisturí N°3 para el corte y disección del plano epitelial
- Pinzas mosquito
- Pinza para tejidos
- LegraP23 para la visualización del hueso
- Turbina NSK
- Unidad portátil
- Fresas quirúrgicas tallo largo cilíndrica N°702 para la creación del defecto óseo regular y simétrico
- Jeringas de 10cc para la irrigación del área
- Compás para marcar y medir el defecto antes y después del desgaste
- Regla milimetrada para la medición del defecto
- Pinza porta-agujas
- Tijera Mayo, para cortes de las secciones de hueso posterior al sacrificio
- Tijeras para cortar suturas
- Marcadores y etiquetas para el marcaje de los animales de experimentación y sus cajas.

### **3.5.5 Equipos:**

- Equipo de Rayos X intraoral digital Kodak 2200
- Cámara fotográfica semi-profesional marca Samsung
- Centrifuga mecánica.
- Microscopio óptico de doble cabezal (Nikod®)
- Maquina procesadora de tejido de marca Start Tissue – Tek II

## **3.6 Procedimientos, materiales, equipos e instrumentos**

### **3.6.1 Fase I: Prueba piloto**

Para asegurar la viabilidad y confiabilidad de la investigación, cumplir con las normas de bioética requeridas para el trabajo con animales de experimentación, además de comprobar la biocompatibilidad de los materiales empleados durante el procedimiento y realizar el defecto óseo en la tibia del animal; se realizó una prueba piloto en 2 ratas de la cepa Wistar con un peso aproximado de 400 gr; la cual se llevó a cabo dentro de las instalaciones del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA) durante la semana previa al inicio de la investigación.

### **3.6.2 Fase II: pre – operatoria. Selección de grupos.**

Se usaron 23 ratas de la cepa Wistar, las cuales se dividieron en 3 grupos; uno experimental constituido por 21 ratas a las que se le aplicó en la tibia derecha hormona de crecimiento combinada con fibrina inyectable, un grupo control representado por las mismas 21 ratas del grupo anterior, pero a estas solo se les administró fibrina inyectable en la tibia izquierda, y por último un grupo control-control que estuvo compuesto por 2 ratas, las cuales no fueron sujetas a experimentación.

Luego de la seleccionar los grupos, organizar las mesas de trabajo con todos los insumos, instrumental y equipos necesarios, se asignaron de forma aleatoria los

animales a cada grupo de evaluación 3, 6 y 9 semanas, identificándolos por marcas de color rodeando la base de la cola de los animales, de acuerdo al grupo de estudio.

### 3.6.3 Obtención de la muestra sanguínea

La obtención de la muestra se realizó bajo anestesia, mediante la técnica de sangrado del seno venoso orbital, que implicó pinchar el seno venoso detrás del globo del ojo con un capilar; ya que es un método útil para obtener buenas muestras. Se usó una sola órbita recolectando entre 1,5 a 2 ml de sangre en tubos secos de tapa roja que no contenían anticoagulantes. (Fig. 12)



**Figura 12.** Recolección de muestra de sangre. Foto autoría propia

### 3.6.4 Obtención de la fibrina inyectable:

- Una vez obtenida la muestra sanguínea, se llevó inmediatamente a la centrifuga por 2 minutos a 1.300 rpm a fuerza G de 1790 en una

centrifuga mecánica, dicho protocolo se estandarizó en la prueba piloto previamente realizada, modificándose el protocolo descrito por Choukron para obtener dicha fibrina.

- Luego del tubo de ensayo previamente centrifugado se procedió a aspirar con una jeringa de insulina solo el PRF superior el cual está en estado líquido.
- Se activó la hormona de crecimiento mezclando el contenido de polvo liofilizado con un 1 ml de solución fisiológica.
- Se aspiró del envase 1 UI de hormona de crecimiento y luego se transfirió ésta a la jeringa de la fibrina inyectable; buscando que las proporciones de ambos biomateriales fueran 1:1 y se homogenizaran, para su posterior aplicación en el sitio del defecto en el cual se requería el empleo de ambos biomateriales.

### **3.6.5 Fase III: Operatoria. Procedimiento quirúrgico.**

- Se aplicó el anestésico general Ketamina en dosis de 100 mg/kg combinada con xilacina 5 mg/kg, vía intraperitoneal, y también se administró en dosis de 0,25 ml la Lidocaína (Rapicaine®) al 2% con adrenalina al 1.100.000 (anestésico local), previa asepsia de la zona, se realizó una incisión con hoja de bisturí No 15 de 2 cm de longitud sobre la cara anterior de ambas patas traseras, luego se separó la piel y el espacio intramuscular hasta observar el musculo y el hueso. Y se procedió a realizar el defecto óseo con una turbina y fresa troncocónica 702 de aproximadamente 3 mm irrigando constantemente la zona con solución fisiológica.
- Luego se implantó el material de relleno que correspondía a cada grupo en el defecto creado y se suturó el musculo con sutura reabsorbible Vicryl® 4-0 y la piel con sutura no reabsorbible. (Figura 13)





**Figura 13.** Procedimiento quirúrgico realizado en la tibia del animal de laboratorio.

#### 3.6.6 Fase IV: Post – operatoria.

- Inmediatamente terminada la cirugía se les administró analgésico-antiinflamatorio (Meloxicam 1 mg/kg) y antibiótico (Lincomicina, 0.015 ml) por vía subcutánea en dosis únicas. Esta medicación se continuó cada 24 horas por 3 días. Los animales se ubicaron en jaulas individuales, y fueron vigilados y alimentados por el personal técnico del BIOULA.
- A las 3, 6 y 9 semanas, se escogieron 7 ratas por grupo de experimentación para el sacrificio mediante la sobredosis inhalatoria de Enflurano USP al 100% mediante el uso de una cámara de gas, para luego obtener las muestras de tejidos óseo que fueron inmersas en formol al 10% para los posteriores análisis histopatológicos y radiográficos correspondientes. Una vez obtenidas las muestras se procedió a la disposición de los cadáveres, mediante su incineración en las instalaciones de BIOULA.
- Para el análisis histopatológico las muestras fueron descalcificadas con ácido nítrico al 2% centrifugándolas a 4.000 rpm por 20 minutos cada 8 horas durante un día, luego se cortaron con una hoja de bisturí No 10 y se colocaron en casetes previamente identificados, para introducirlos en una

maquina procesadora de tejido de marca Start Tissue – Tek II, en la cual se cumplieron las siguientes fases:

1. Deshidratación con alcoholes de gradación creciente.
2. Aclaramiento con xilol, que desplazó el alcohol para permitir la miscibilidad con la parafina fundida.
3. Embebimiento de la parafina liquida.
4. Inclusión en parafina.
5. Cortes de 5 micrómetros con un micrótomo y montaje en láminas portaobjetos.
6. Tinción con Hematoxilina y Eosina.

Una vez realizado esto las muestras fueron observadas en un microscopio de luz Nikon® y luego se realizó el llenado del instrumento. (Anexo B)

### 3.7 Principios bioéticos

Los códigos de éticas nacionales e internacionales establecen que cualquier investigación realizada en seres humanos debe ser diseñada en relación a los resultados previos de investigaciones realizadas en animales de experimentación<sup>120</sup>.

Para conseguir el bienestar de los animales de laboratorio, se siguieron las normas vigentes para cada especie en relación a los siguientes factores: temperatura, humedad, ciclos de luz, limpieza, socialización entre otros, además, reducir el número de prácticas experimentales innecesarias<sup>120</sup>. Por ello la presente investigación se realizó bajo condiciones establecidas por la Asociación Venezolana para la Ciencia de los animales de laboratorio (AVECAL) y por el Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología (FONACIT), la cual expone que los animales de experimentación deben ser tratados como organismos vivos sensibles para evitar o minimizar cualquier incomodidad, sufrimiento o dolor<sup>121</sup>. De igual modo, aquellos animales que ameritan

procedimientos dolorosos, se les aplicará sedantes, analgésicos o anestesia; y en casos de sacrificio se realizará de manera no dolorosa<sup>122</sup>.

Dentro de los aspectos éticos se tomaron en cuenta:

- Utilizar la cantidad mínima necesaria de animales para obtener datos estadísticos válidos.
- Este proyecto fue presentado, discutido y aprobado por el Comité de Ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes (CEBIOULA).
- La experimentación fue realizada en el área quirúrgica del bioterio de la universidad de los andes, bajo la supervisión de docentes y empleados con experiencia en el manejo de animales de laboratorio<sup>120</sup>.
- Los animales se mantuvieron en un ambiente apropiado con cierto grado de libertad de movimiento, alimento, agua y cuidados adecuados para asegurar su salud y bienestar.
- Las autoras realizaron y aprobaron el curso de manipulación de animales de laboratorio en el Bioterio de la Universidad de Los Andes.

### **3.8 Análisis de resultados**

Para describir los hallazgos radiográficos y los hallazgos histológicos del grupo experimental y del grupo control, se elaboraron tablas cruzadas y gráficos de barra.

Las medidas radiográficas se analizaron a través de la prueba T de Student para muestras independientes, siendo usada cuando la distribución de todas las pruebas muestrales no tienen un comportamiento similar a la distribución normal, a pesar una distribución continua<sup>123</sup>; además esta prueba sirve para hacer inferencia sobre las medias<sup>124</sup>.

Para comparar los hallazgos histológicos del grupo experimental y el grupo control en 3 momentos, a las 3, 6 y 9 semanas se usó la prueba no paramétrica de Kruscal Wallis, equivalente a un ANOVA, pero para datos cualitativos ordinales

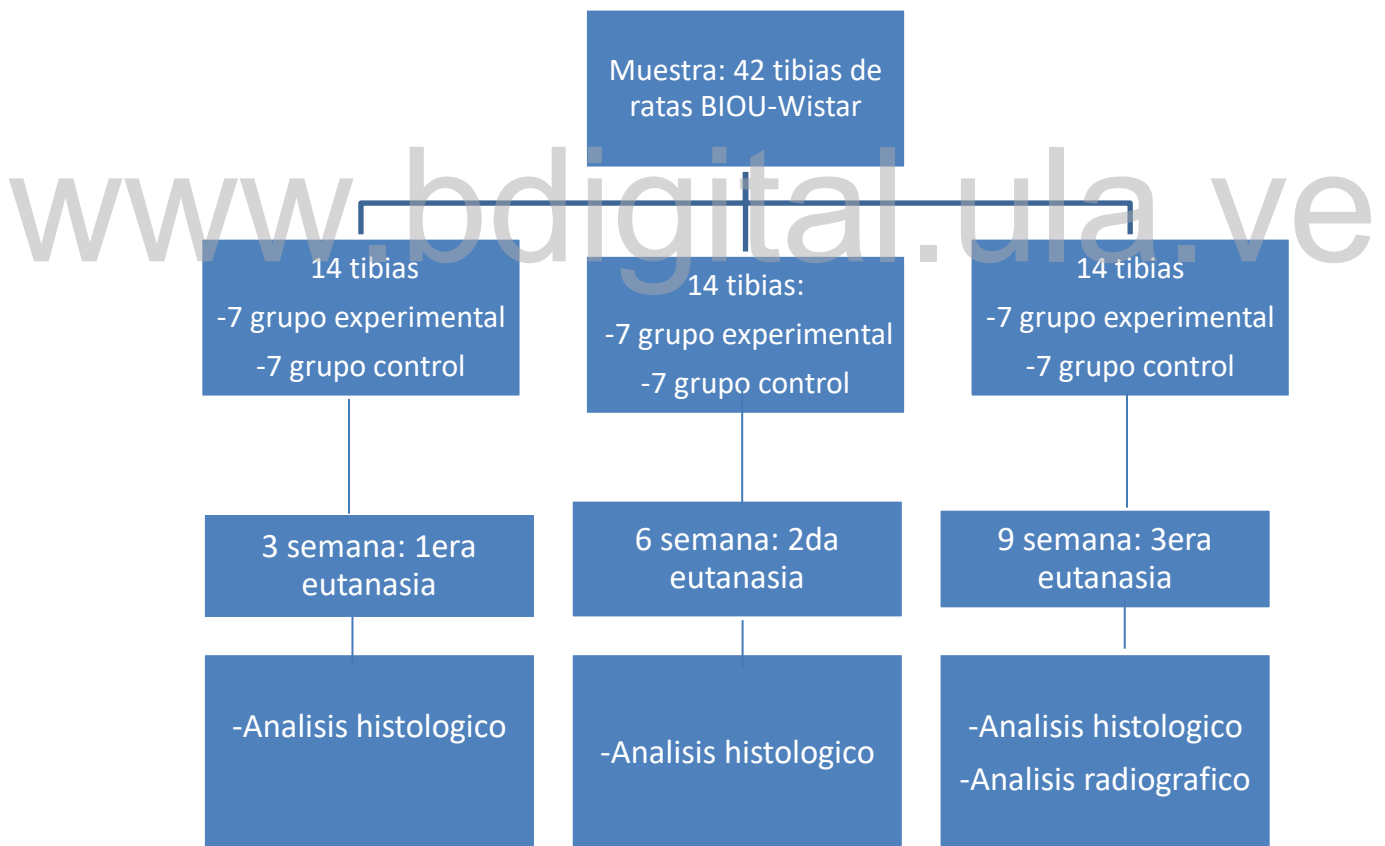
Para graficar los datos de las variables se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2013 y se usó el SPSS para las pruebas estadísticas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

A continuación, se presentan los hallazgos obtenidos y su discusión. La muestra estuvo conformada por 21 ratas machos adultos de la cepa BIOU-Wistar, divididas al azar en tres grupos de experimentación, de acuerdo al tipo de biomaterial presente en el defecto óseo creado más el grupo control-control, y a su vez clasificados en sub-grupos de acuerdo a las semanas de sacrificio, a las 3, 6 y 9 semanas post-quirúrgicas. Una vez obtenidas las muestras necesarias se evaluó el grado de regeneración ósea en las tibias de los animales de manera radiográfica e histopatológica en distintas semanas.



**Figura 14.** Distribución de especímenes y sus tiempos de sacrificio.

### **3.9 Hallazgos radiográficos**

#### **3.9.1 Hallazgos radiográficos cualitativos**

##### *3.9.1.1 Radiopacidad del área intervenida y continuidad del defecto con el área circundante*

Para estimar estos parámetros se siguió una lista de cotejo que muestra 4 niveles donde cada muestra se iba observando y se ubicaba en el nivel al cual correspondiera. Un nivel 0 donde se observaría un defecto totalmente radiolúcido sin variación radiográfica; un nivel 1 en el que se evidenciaría imágenes radiopacas en los márgenes del defecto mostrando así un relleno óseo limitado; un nivel 2 en el cual el defecto sería parcialmente radiopaco, con regiones de radiolucidez y radiopacidad que indicarían la formación de hueso nuevo; y por último, un nivel 3 donde se lograría un relleno óseo completo evidenciándose continuidad de los márgenes del defecto y éste se observaría radiopaco en su totalidad.

La *radiopacidad* del área intervenida es valorada como la imagen radiográfica más densa o clara, debido a la gran densidad que posee el tejido que debería formarse dentro del defecto óseo; y también, fue valorada en función de la cantidad y extensión de la aposición mineral, lo que nos iría mostrando el nivel de neoformación ósea o nivel de mineralización del hueso. Seguidamente, teníamos el segundo parámetro *continuidad del defecto con el área circundante* que fue valorado si dicha aposición ósea mantuvo continuidad o no con las paredes en la periferia del defecto.

En relación a lo anterior, se observó que el 43% de las muestras del grupo experimental llegaron a alcanzar un nivel 3 de regeneración ósea, es decir, se logró una regeneración completa, el restante de tibias alcanzó el nivel 2; por el contrario, para grupo control no se pudo evidenciar este hallazgo ya que ninguna de sus muestras alcanzaron este nivel, solo un 43% de sus muestras alcanzó un nivel 2 de relleno óseo parcial, y el restante de las tibias correspondientes a éste grupo se ubicaron en un nivel 1 y hasta en un nivel 0. Grafico 1.

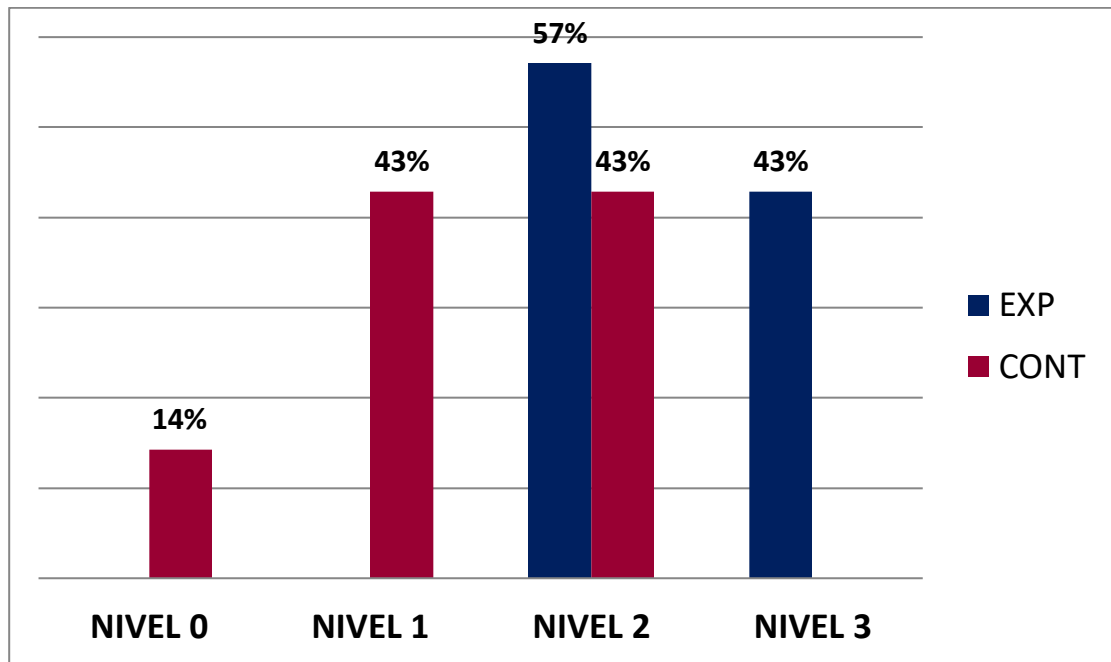


Gráfico 1. Nivel de regeneración ósea alcanzada a las 9 semanas post quirúrgicas para el grupo experimental y el grupo control.

### 3.9.2 Hallazgos radiográficos cuantitativos

#### 3.9.2.1 Extensión de la radiopacidad

Para estimar este parámetro se tomó en cuenta el área de extensión de los defectos óseos al inicio y al final del experimento. Para ello se midió la longitud por el ancho del defecto óseo, se multiplicaron ambas mediciones para hallar el área expresada en milímetros cuadrados alcanzado a las 9 semanas.

En el grupo experimental se observó que hubo menor área de extensión que en el grupo control como se puede apreciar en el grafico 6. De forma detallada para el grupo experimental el área alcanzada fue de 45mm<sup>2</sup>, mientras que para el grupo control fue de 47mm<sup>2</sup>.

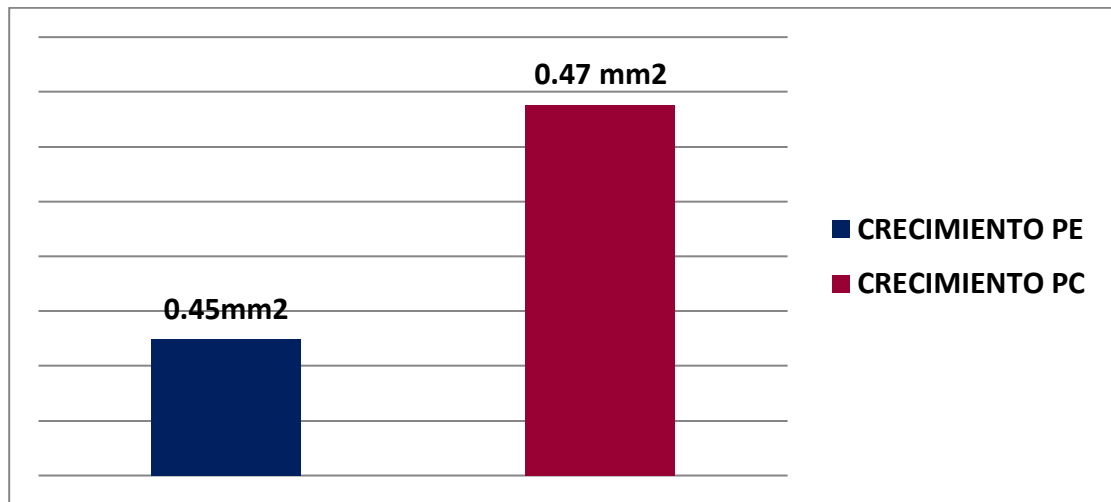


Gráfico 2. Área de extensión de radiopacidad alcanzada a las 9 semanas por ambos grupos de estudio.

### 3.9.2.2 Porcentaje de regeneración ósea

Adicionalmente partiendo de las medidas anteriores para cada tibia (área de extensión de radiopacidad), se obtuvo una medida porcentual de la neoformación ósea o porcentaje de regeneración ósea alcanzada en cantidad o cuantitativamente por la fórmula explicada en el anterior capítulo de marco metodológico. Partiendo de dicha fórmula se evidenció el porcentaje alcanzado de regeneración ósea final en función del área inicial.

Con respecto a lo anterior, se pudo apreciar que a las 9 semanas la frecuencia para ambos grupos de estudio (experimental y control) era muy similar; el grupo experimental obtuvo un 90% de regeneración ósea, mientras que en el grupo control se evidenció una regeneración ósea un poco más marcada de un 94%. Gráfico 3.



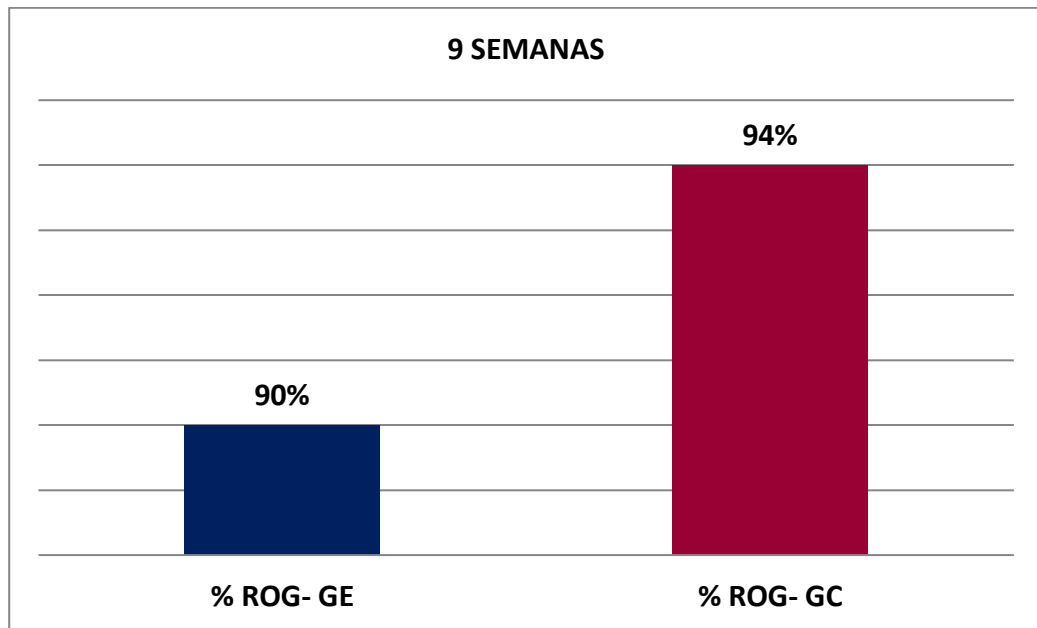


Gráfico 3. Porcentaje de regeneración ósea alcanzada a las 9 semanas para ambos grupos de estudio.

Tabla 2. Prueba T. significancia estadística radiográfica de la 9 semana del grupo experimental

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
CRECIMIENTO P1 Se han asumido varianzas iguales	4,485	,056	,380	12	,711	4,143	10,906	-19,618	27,904
No se han asumido varianzas iguales			,380	8,583	,713	4,143	10,906	-20,711	28,997

**Tabla 3.** Prueba T. significancia estadística radiográfica de la 9 semana del grupo e control.

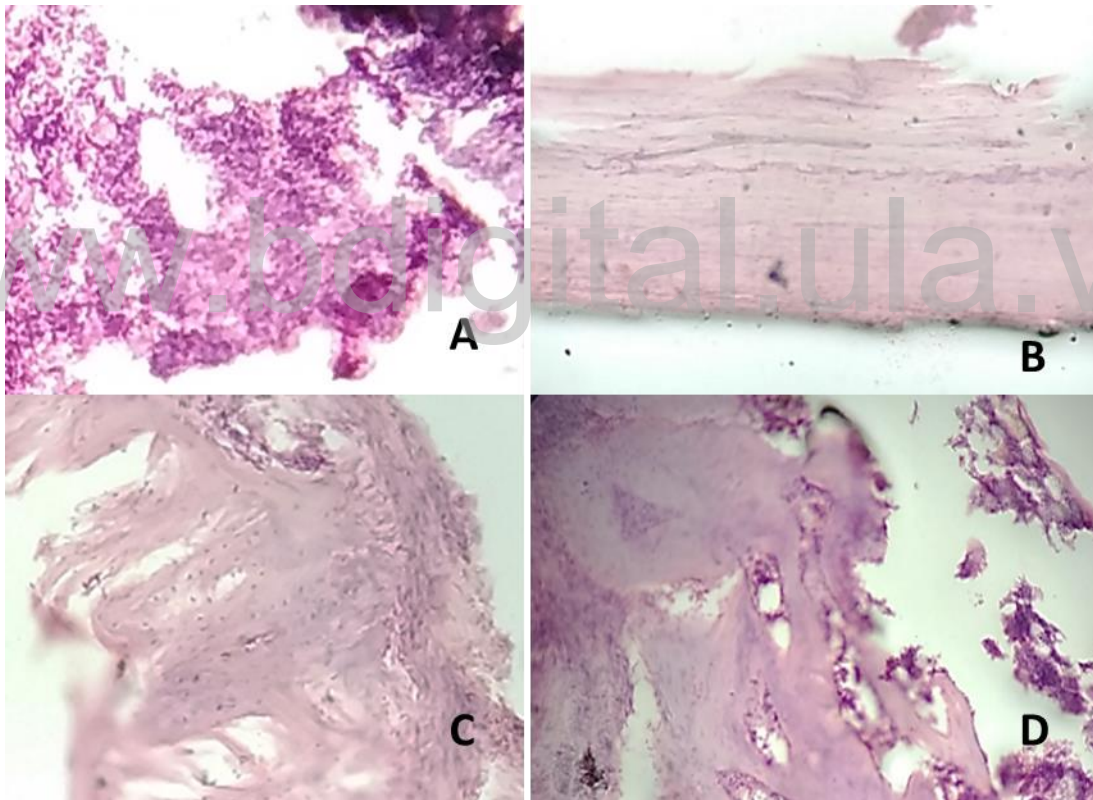
		Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error ttp. de la diferencia	Inferior	Superior		
CRECIMIENTO P2	Se han asumido varianzas iguales	2,801	,120	-,818	12	,429	-8,429	10,303	-30,877	14,020		
	No se han asumido varianzas iguales			-,818	8,848	,435	-8,429	10,303	-31,797	14,940		

Ninguna prueba T resultó significativa (Significancia mayor a 0,05). Esto quiere decir que en el momento evaluado no se encontraron diferencias significativas en la evaluación radiográfica.

www.bdigital.ula.ve

### 3.10 Hallazgos Histológicos

Para el estudio histopatológico de las distintas muestras, se consideraron 42 tibias, las cuales fueron analizadas por microscopia de luz de acuerdo con la escala modificada propuesta por Castillo, donde se tomaron en cuenta los siguientes indicadores: tejido de granulación, tejido conectivo, hueso inmaduro, hueso maduro, cuerpo extraño, y la evaluación se llevó a cabo mediante el análisis cualitativo por cantidad de células en el campo observadas por el patólogo: Ausente, Escaso, Moderado y Abundante. Seguidamente, una vez analizados dichos parámetros se estableció el nivel de regeneración ósea de acuerdo con los indicadores: Nivel I (25%), nivel II (50%), nivel III (75%), nivel IV (100%).



**Figura 15.** Cortes histológicos observados a 40X donde se evidencia: A) Nivel I de RO B) Nivel II de RO C) Nivel III de RO D) Nivel IV de RO. Fuente propia.

### 3.10.1 Tejido de granulación

A las 3 semanas el grupo control demostró prevalencia del tejido de granulación de forma abundante en un 43%, en contraste al grupo experimental en el cual se observó de forma moderada en un 71% de las muestras. Sin embargo, a las 6 semanas el grupo control paso de abundante a ausente detectándose este hallazgo en un 86% de las muestras, manteniéndose totalmente ausente a las 9 semanas. El grupo experimental progreso de moderado a escaso en un 57% de las muestras a las 6 semanas, mientras que a las 9 semanas evoluciono a totalmente ausente. Esto quiere decir que a partir de la 6ta semana el grupo control evidencio más avance en dicho tejido con respecto al grupo experimental (Grafico 4).

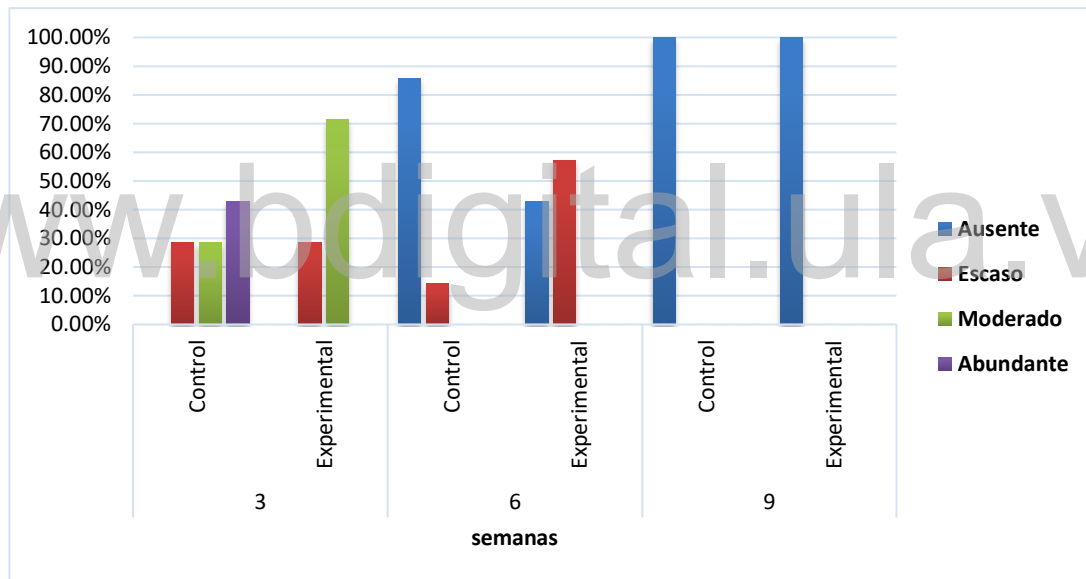


Gráfico 4. Nivel histológico de tejido de granulación.

### 3.10.2 Tejido conectivo

Otro criterio a tomar en cuenta es la presencia de tejido conectivo representado por células ahusadas organizadas en la periferia, lo que demuestra la migración celular para su posterior diferenciación en células que garantizan la neoformación. A las 3 semanas en el grupo control se observó una fibrosis moderada en la totalidad de las muestras, mientras que en el grupo experimental se evidenció escasamente en el 86% de las

muestras. Seguidamente a las 6 semanas, el grupo control evidenció un decremento de dicho tejido y paso de moderado a escaso en el 57% de las muestras, en contraste al grupo experimental el cual mantiene el predominio escaso y solo decremento ligeramente a un 71%. A las 9 semanas esta fibrosis prácticamente desaparece para ambos grupos siendo superior para el grupo control. (Gráfico 5).

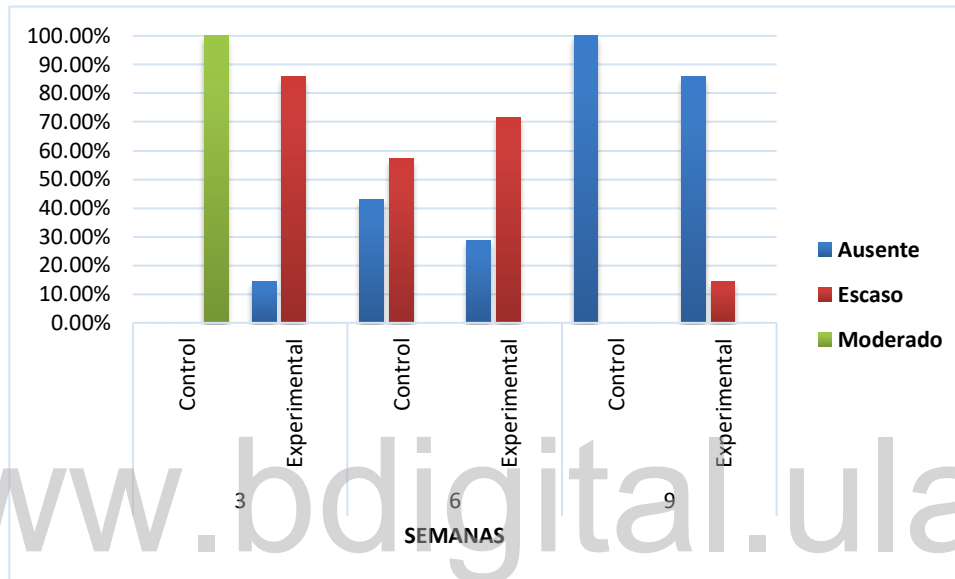


Gráfico 5. Nivel histológico de tejido conectivo.

### 3.10.3 Hueso inmaduro

En este nivel se observó un hueso bastante celular y vascular constituido por osteoblastos que forman el hueso desorganizado, además las trabéculas se observan homogéneas. Respecto a lo anterior, se observó que el grupo control mostró escasa formación de hueso inmaduro en un 71% a las 3 semanas, debido a que en estas semanas se sospecha que el defecto aun estuviese en la fase de creación de tejido de granulación, por otro lado, el grupo experimental evidenció la formación de hueso inmaduro de forma moderada en un 57% lo que demuestra que en estas semanas la mayor parte de las muestras ya se encontraban en una fase más avanzada. A las 6 semanas, el grupo control progresó de ser escaso a moderado en un 43% mientras que el grupo experimental mantuvo su patrón de moderado en mayor porcentaje alcanzando

el 71% de las muestras. A las 9 semanas cambió la tendencia y el grupo control mostró incremento gradual de hueso inmaduro moderado del 86%, por el contrario, en el grupo experimental dicho hueso pasa a ser escaso. Este evento ocurre debido a que ya el grupo experimental se encontraba en una fase más adelantada. Se observó que el grupo experimental evoluciona más rápidamente en cada semana, en comparación con el grupo control, que también evoluciona, pero más lento. (Gráfico 6)

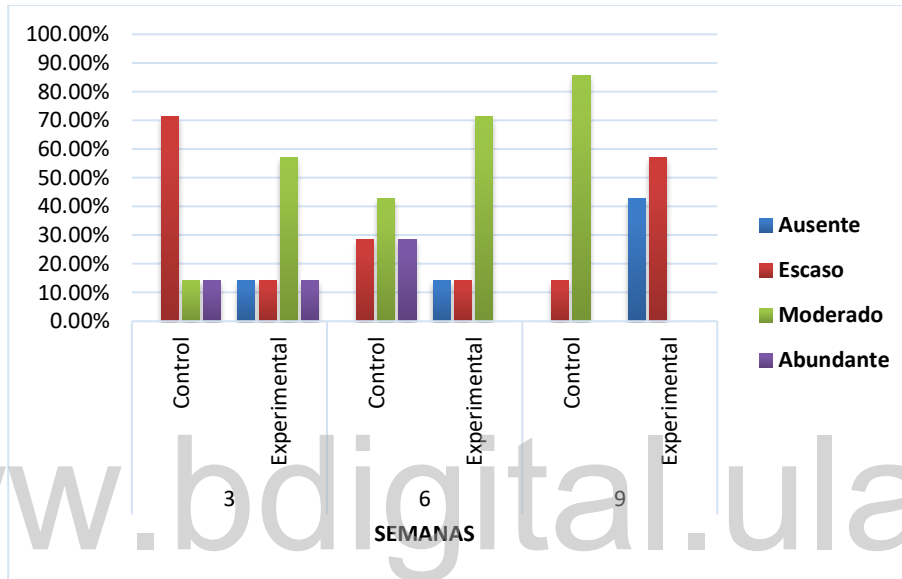


Gráfico 6. Nivel histológico de hueso inmaduro

### 3.10.4 Hueso maduro

A las 3 semanas no se observó hallazgos de dicho hueso en ambos grupos, debido a que el defecto óseo se encontraba en sus primeras fases de neoformación. Sin embargo, en la segunda evaluación (6 semanas) se evidenció el hueso maduro de forma escasa en el grupo experimental en el total de las muestras y en el grupo control en un 43%. En la tercera evaluación (9 semanas) se observó un cambio significativo ya que el hueso maduro evoluciona a moderado en un 71% de las muestras del grupo control, y en la totalidad de las muestras del grupo experimental. Esto quiere decir que en el grupo experimental hubo mineralización del hueso, mientras que en el grupo control no sucedió este fenómeno. Se obtuvo una secuencia lineal en el grupo experimental ya que el total de las muestras siempre mostraban un patrón para cada semana, cosa que

no sucede con el grupo control ya que la evidencia de hueso maduro en las últimas semanas muestra variabilidad, muestras tres patrones diferentes. (Gráfico 7).

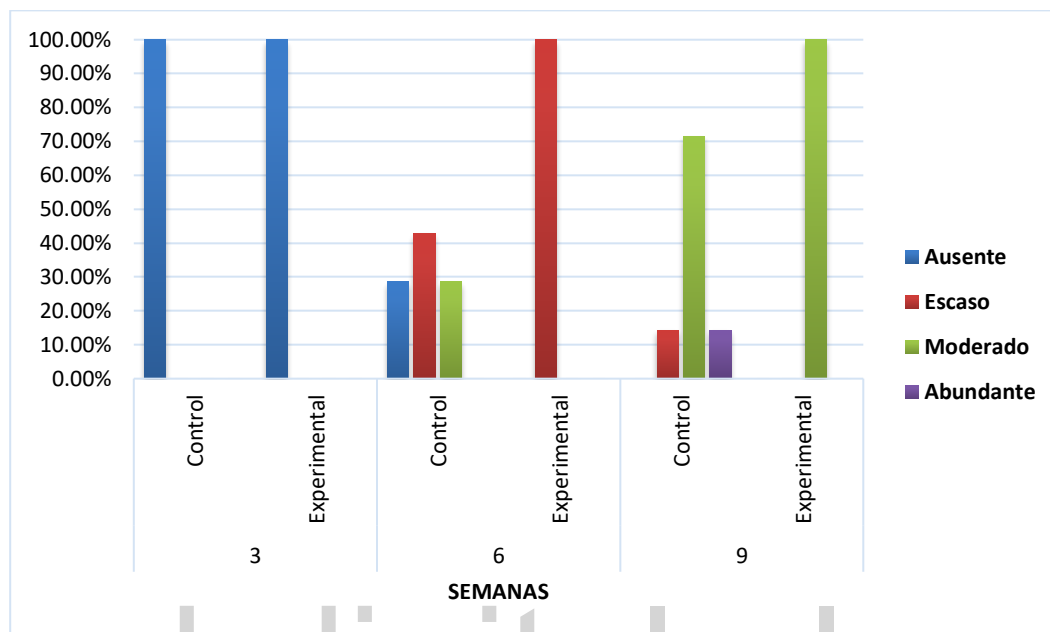


Gráfico 7. Nivel histológico de hueso maduro

**Tabla 4.** Prueba de Kruskal Wallis. Significancia estadística del hueso maduro.

Estadísticos de contraste,		
	Hueso maduro HFCI	Hueso maduro Control
Chi-cuadrado	20,000	14,376
Gl	2	2
Sig. asintót.	,000	,001

En esta prueba se observó que los dos grupos presentaron recuperación diferente y además resultaron significativos tanto para el grupo experimental como para el grupo control; por lo tanto, dichas pruebas arrojaron diferencias significativas ( $p\_valor \leq 0.005$ ) para el grupo experimental en el porcentaje de hueso maduro, siendo este el

parámetro que determinó la regeneración ósea; rechazando así, la hipótesis nula, que indicaba que no existiría diferencias en la regeneración ósea alcanzada entre los grupo de estudio, y entrando en vigencia la hipótesis alternativa donde la combinación GH/i-PRF resulta más efectiva en la regeneración que solo la aplicación de i-PRF.

### **3.10.5 Niveles histológicos de regeneración ósea**

Al analizar los parámetros obtenidos de los cortes histológicos se observó que, a las 3 semanas, el 100% de las muestras de ambos grupos de estudio se ubicaron en un nivel II de regeneración ósea, ya que destacaba la presencia de tejido de granulación y ciertas zonas de formación osteoide. Seguidamente, a las 6 semanas se observó que el 86% de las tibias del grupo control alcanzan un nivel III de regeneración ósea, en contraste, con el grupo experimental que solo el 43% de las tibias alcanzaron este nivel, mostrando en esta semana el grupo control predominio de células osteoblásticas y centros de formación de osteoide, sobre el grupo experimental. Finalmente, a las 9 semanas se evidenció en el grupo experimental predominio de focos de mineralización osteoide y la presencia de hueso maduro llenando la mayor parte del defecto en el 100% de las muestras, alcanzando un nivel IV de regeneración ósea, similar a la regeneración del hueso sano. Con respecto al grupo control, sigue destacándose la presencia de células osteoblásticas y algunos focos de mineralización osteoide, pero sin predominio del hueso maduro, quedándose el 100% de las muestras en un nivel III de regeneración ósea con respecto a la escala establecida.



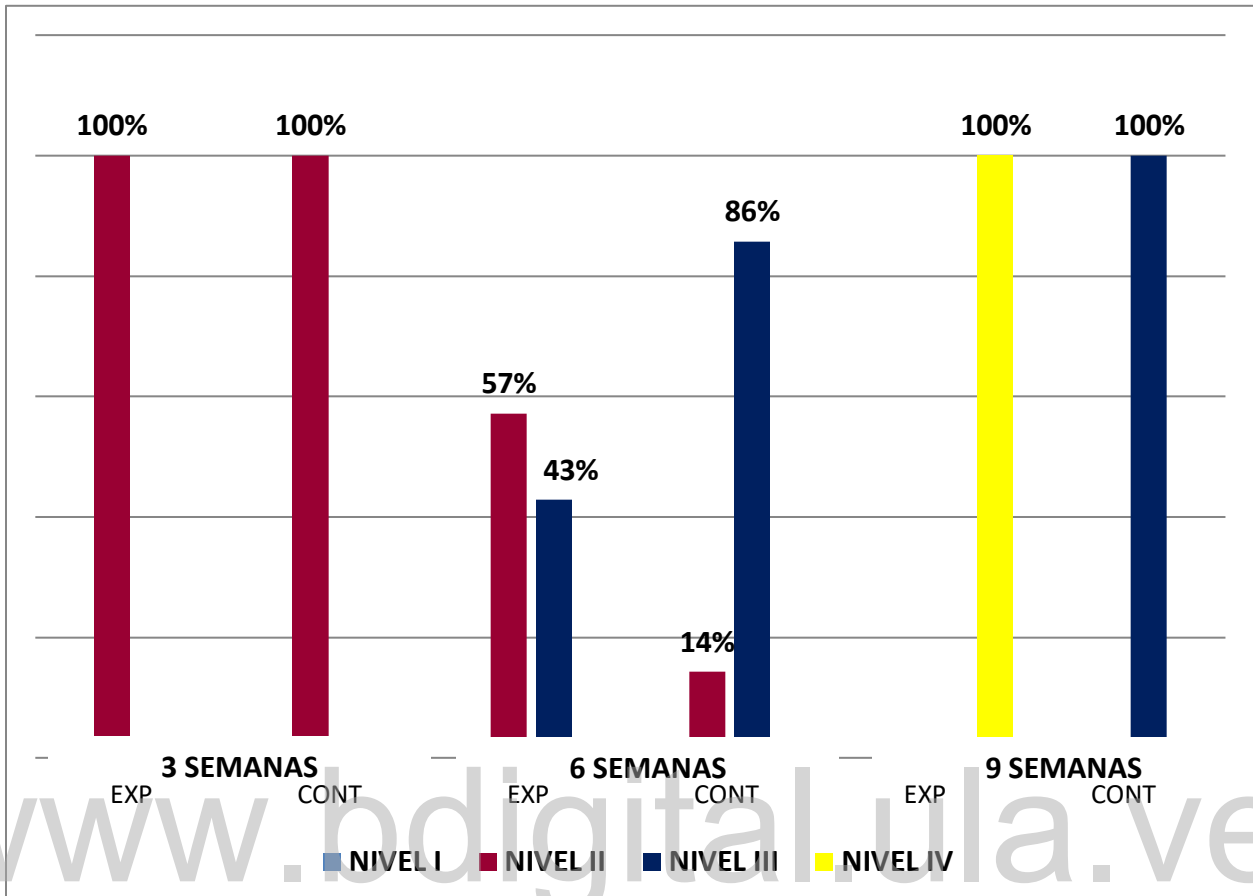


Gráfico 8. Niveles histológicos de la regeneración ósea obtenida a las 3, 6 y 9 semanas, tanto en el grupo experimental como control.

## DISCUSIÓN

En los últimos años diversos grupos de estudios dedicados a la investigación en cirugía y traumatología bucomaxilofacial y en implantología oral han utilizado numerosos compuestos para mejorar la respuesta ósea. Entre los más importantes se encuentran los factores de crecimiento como el i-PRF y más recientemente las hormonas, como por ejemplo, la hormona de crecimiento.

En esta oportunidad se estudió la efectividad de la hormona de crecimiento combinada con la fibrina inyectable en defectos realizados en la tibia de ratas para regeneración ósea, y evaluar posteriormente su posible aplicabilidad clínica.

### **Determinación radiográfica de los niveles de relleno óseo y la regeneración ósea alcanzada**

Para la realización del *análisis radiográfico cualitativo*, se tomaron en cuenta dos parámetros; radiopacidad y radiolucidez. En relación a esto, se evidenció que el 43% de las muestras del grupo experimental alcanzó el relleno óseo completo; similar al estudio de Ortega y Paredes<sup>85</sup>, donde a los 60 días de la implantación del PRF el 40% de las muestras obtuvieron un nivel de regeneración grado 3. Los grupos estudiados con ambos materiales demostraron proliferación de tejido óseo evidente radiográficamente, logrando acelerar el proceso de regeneración ósea, lográndose un hueso similar al sano, es decir, se generó un hueso de calidad. Estos resultados pueden atribuirse a la capacidad que tienen los materiales utilizados para unirse a los osteoblastos y promover la maduración ósea.

Además, se realizó un *análisis radiográfico cuantitativo* donde se observó la cantidad (extensión o área) de hueso neoformado dentro de los defectos realizados. Al respecto, los resultados radiográficos obtenidos señalaron una tendencia en las tibias tratadas con i-PRF (grupo control) con un predominio de en un 94% de ganancia ósea, obteniendo así un alto porcentaje de regeneración. Comparado con un estudio clínico en el área de periodoncia donde al control radiográfico se observó la formación total del hueso en el área del defecto y también en un estudio clínico en Endodoncia que al

control radiográfico hubo formación de matriz ósea en el defecto óseo; por lo tanto el PRF puede ser usado para regenerar pequeños y grandes defectos óseos ya que se obtiene una respuesta esperada y asociada a la posibilidad del biomaterial para actuar como osteoconductor, al brindar soporte, contacto y adhesión celular; este comportamiento ha sido confirmado por varios estudios<sup>125-127</sup>, donde se evidenció que el i-PRF actúa como andamio liberando lentamente factores de crecimiento, además favorece al aumento en número de leucocitos y puede estimular aún más factores.

En comparación, el grupo experimental mostró una pequeña diferencia con el grupo control, ya que obtuvo menos porcentaje de regeneración ósea (90%) esto pudo deberse a la superposición de estructuras óseas de la tibia de las ratas en las imágenes o el ángulo de toma de radiografías, quedando a criterio de próximos investigadores la posibilidad de realizar este tipo de investigaciones con pruebas más avanzadas como estudios tomográficos.

Aún y cuando sucedió este fenómeno, hubo una buena osteoinducción por parte de estos dos biomateriales, ya que estimularon el crecimiento de hueso en el sitio donde se implantó, comportándose la GH como excelente regenerador óseo, ya que media la interacción osteoblasto-osteoclasto e interviene de forma activa en el remodelado óseo tal como lo expresa Arrienti<sup>10</sup> en su estudio; y el i-PRF como andamio bioactivo para mantener la GH en el sitio a tratar, además de potenciar el relleno del defecto.

**Determinar histológicamente los niveles de regeneración ósea guiada a las tres, seis y nueve semanas.**

La combinación de la GH y el i-PRF evidenciaron efectividad para la regeneración ósea guiada en defectos óseos de ratas BIOU: Wistar ya que se alcanzaron los resultados esperados, iniciando en la tercera semana postquirúrgica con un nivel II de regeneración ósea para ambos grupos, destacándose la presencia de tejido de granulación y ciertas zonas de mineralización osteoide; lo cual ocurrió en el estudio de Olivares y Pineda<sup>89</sup>, donde usaron la misma metodología de estudio pero usaron distintos biomateriales, y se observó a las 3 semanas que la mayoría de las muestras se ubicaron en el nivel II de regeneración ósea en los grupos experimental y control,

destacándose la presencia de tejido de granulación y ciertas zonas de mineralización osteoide. La presencia de tejido de granulación coincide con lo expuesto por Harms<sup>128</sup>, el cual confirma que la presencia de vasos sanguíneos proporciona suministro adecuado de sangre en el área afectada, paso previo a la actividad celular. Este hallazgo indica un equilibrio entre la resorción ósea y la formación de hueso nuevo durante el proceso de remodelación posterior a la implantación de los biomateriales.

Seguidamente a la sexta semana se observó en ambos grupos un incremento gradual en el porcentaje de regeneración, evidenciándose mayor cantidad de osteocitos en las muestras estudiadas, con disminución del número de osteoblastos, lo que indica una maduración de la matriz osteoide previamente formada, pero sin mineralización (nivel III), además se observó una fibrosis abundante de la cual se desencadena la formación de hueso inmaduro, observándose en gran cantidad; coincidiendo con varios estudios<sup>89,128,129</sup>, estableciendo que a la sexta semana comienza un proceso de reabsorción y aposición ósea alternado para la adaptación del hueso tras la aplicación de biomateriales.

A la novena semana el total de las muestras del grupo tratado con los dos biomateriales se encontraban en nivel IV, ya que se evidenció la formación de hueso maduro, con mineralización de gran parte del defecto óseo, similar al hueso sano. Con respecto a las tibias tratadas solo con i-PRF, mostraron que la totalidad obtuvieron un nivel III de regeneración no llegando a alcanzar una regeneración completa, se sigue observando focos de mineralización osteoide, pero no completamente, es decir, predomina el hueso inmaduro sobre el hueso maduro, éste último empezándose apenas a observar.

Dicho comportamiento se repite en las misma semana en el estudio de Olivares y Pineda<sup>89</sup> en el 2017, los cuales usaron diferentes biomateriales pero aplicaron la misma metodología al momento de realizar la investigación, estos autores obtuvieron que solo el 80% de sus muestras llegaron a alcanzar el máximo nivel de regeneración, por el contrario en el presente estudio se observó que el total (100%) de las muestras del grupo experimental alcanzaron el máximo nivel de regeneración ósea, donde la cantidad de nuevo hueso incremento de la sexta a novena semana, además de producirse la

maduración continua de este nuevo hueso. En relación a lo anterior, se puede decir que posiblemente esta diferencia entre ambos estudios se deba a que los biomateriales usados en la presente investigación (GH e i-prf) pueden ser más efectivos al momento de buscar regenerar hueso similar al sano, potenciando el tiempo en que se regenera y la calidad de hueso que se obtiene.

La cavidad remanente o defecto óseo que queda posterior a un tratamiento quirúrgico debe ser rellenada preferiblemente con biomateriales de origen autólogo, para que sean las células madres las que guíen los procesos de osteoconducción y osteoinducción, garantizando la morfología y densidad ósea del área del defecto; además, de un hueso de calidad similar al hueso sano o circundante. Por lo que diversos biomateriales han presentado gran auge para la regeneración ósea guiada, destacándose la hormona de crecimiento y el I-PRF; tal como lo demostró un estudio in vitro realizado por Wang et al <sup>125</sup> donde compararon el PRP y el i-PRF y obtuvieron que el i-PRF demostró un aumento 3 veces más que el PRF en la migración de osteoblastos a los tres y cinco días.

En este estudio, se establece una relación de concordancia en el porcentaje de regeneración ósea entre los resultados obtenidos de la evaluación radiográfica y la evaluación histopatológica a las 9 semanas; demostrando que la combinación de la GH con el i-PRF funcionan para la formación de hueso nuevo, puesto que al ser implantado en los defectos óseos de animales de experimentación, actúan como relleno promoviendo la osteoconducción y osteoinducción, además el i-PRF actúa como andamio manteniendo la hormona en el defecto, y así acelerando la actividad celular de la regeneración ósea, demostrando excelentes resultados en cuanto a la tolerancia, biocompatibilidad y osteointegración, actuando como barrera para evitar la invaginación de tejidos blandos.

La combinación GH e i-PRF, es una nueva alternativa para diferentes áreas de medicina y odontología, lo que permite a los expertos seguir investigando estos biomateriales. Debido a que al ser autógenos disminuyen las posibilidades de reacciones adversas al material implantado, y se pueden realizar estudios de forma

rápida y sencilla, lo que lo califica como una opción viable en los procedimientos regenerativos.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO V

### 3.1 Conclusiones

- Respondiendo al objetivo general planteado, se concluye que la hormona de crecimiento y el i-PRF resultaron ser efectivos en el proceso de regeneración ósea en defectos creados en tibias de ratas *BIOU: Wistar*, ya que promueve la neoformación en menor tiempo, comparada con la regeneración fisiológica.
- Las pruebas estadísticas a nivel radiográfico no arrojaron diferencias significativas, esto puede deberse al número reducido de las muestras.
- El análisis estadístico inferencial de las pruebas histológicas demostraron un patrón de recuperación distinto y mayor neoformación ósea en el grupo experimental.
- En la totalidad de los casos experimentales, se evidenció la osteointegración positiva del biomaterial, lo que denotó su biocompatibilidad, bioactividad y bioestabilidad.
- El modelo de experimentación utilizado se consideró ideal para evaluar este tipo de relleno óseo, debido a que su tamaño y peso corporal facilita la manipulación quirúrgica para la creación del defecto óseo y la aplicación de los biomateriales.

### 3.2 Recomendaciones

- Ejecutar el mismo estudio por un período de evaluación mayor, para determinar el tiempo que tarda en producirse la regeneración total de los defectos óseos tratados con biomateriales y los que regeneran fisiológicamente.
- Aumentar el tamaño de muestra de los especímenes para hacer más evidentes las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales y el grupo control.

- Estandarizar la técnica de creación del defecto óseo para así obtener mayor uniformidad en el área del mismo.
- Se recomienda realizar ensayos preclínicos para determinar la eficacia de la hormona de crecimiento y el i-PRF en combinación con otros biomateriales, en la ROG.
- Para próximas investigaciones realizar las pruebas con equipos más avanzados, como el uso de tomógrafo y microscopio electrónico.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



## REFERENCIAS

1. Sierra G, Castro R, González A, Lara J, Chávez A. Proteínas morfogenéticas óseas (BMP): aplicación clínica para reconstrucción de defectos en hueso. *Gac Med Mex* [Internet]. 2016;152:381-5. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2016/gm163o.pdf>
2. Duque H, Olate S, Miranda M, Albergaria J, Mazzonetto R. Análisis Histológico del Proceso de Reparación en Defectos Óseos . Reconocimiento de Defectos Críticos. *Int J Morphol* [Internet]. 2009;27(4):1121-7. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v27n4/art27.pdf>
3. Jensen S, Broggini N, Hjørting E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and  $\beta$ -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(3):237-43.
4. Bernaldes D, Caride F, Lewis A, Martin L. Membranas de colageno polimerizado: Consideraciones sobre su uso en tecnicas de regeneracion tisular y osea guiadas. *Rev Cuba Investig Biomed* [Internet]. 2004;23(2):65-74. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v23n2/ibi01204.pdf>
5. Velazco G, González A, Ortiz R, Yépez J. Membranas tridimensionales de hidorxiapatita y quitosano como terapéutica en regeneración ósea guiada. Estudio de caso. *Int Assoc Dent Res* [Internet]. 2014;2(1):27-34. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/rvio/article/view/4838/4655>
6. Suarez D. Principios básicos en regeneración ósea guiada. *Acta Bioclínica* [Internet]. 2012;2(3):89-116. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/3975/3809>
7. Sjögren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but

is not required for postnatal body growth in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(12):7088-92.

8. Baker AR, Hollingshead PG, Pitts-Meek S, Hansen S, Taylor R, Stewart TA. Osteoblast-specific expression of growth hormone stimulates bone growth in transgenic mice. Mol Cell Biol [Internet]. 1992;12(12):5541-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC360492/pdf/molcellb00135-0271.pdf>
9. Morales O, Lindgren U, Haldose L. Growth Hormone – Regulated Intracellular Signaling in UMR 106 Osteosarcoma Cells. J bone Miner Res [Internet]. 2000;15(11):2284-90. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1359/jbmr.2000.15.11.2284/pdf>
10. Arrienti R. Acción local de la hormona de crecimiento en polvo liofilizado asociada a injertos óseos en cirugía implantológica. Estudio Experimental. [Internet]. Universidad Nacional de La Plata; 2016. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/57405/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=3](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/57405/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=3)
11. Salgado J, Bolognesi J, Henriques L, Naval M, Trindade A, Souza E. Effect of growth hormone in experimental tooth movement. Braz Dent J [Internet]. 2013;24(5):503-7. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/bdj/v24n5/0103-6440-bdj-24-05-503.pdf>
12. Ong CK, Joseph BK, Waters MJ, Symons a L. Growth hormone receptor and IGF-I receptor immunoreactivity during orthodontic tooth movement in the prednisolone-treated rat. Angle Orthod [Internet]. 2001;71(6):486-93. Disponible en: <http://www.angle.org/doi/pdf/10.1043/0003-3219%282001%29071%3C0486%3AGHRAII%3E2.0.CO%3B2?code=angf-site>
13. Lorenz J, Al-Maawi S, Sader R, Ghanaati S. Individualized titanium mesh combined with platelet-rich fibrin and deproteinized bovine bone: A new approach for challenging augmentation. J Oral Implantol. 2018;44(5):345-51.
14. Chenchev I, Ivanova V, Neychev D, Cholakova R. Application of Platelet-Rich

- Fibrin and Injectable Platelet-Rich Fibrin in Combination of Bone Substitute Material for Alveolar Ridge Augmentation - a Case Report. 59(3):362-6.
15. Andreassen TT, Oxlund H. Local anabolic effects of growth hormone on intact bone and healing fractures in rats. *Calcif Tissue Int.* 2003;73(3):258-64.
  16. Hedner EWA, Linde A, Nilsson A. Systemically and Locally Administered Growth Hormone Stimulates Bone Healing in Combination with Osteopromotive Membranes : An experimental Study in Rats. *J Bone Miner Res.* 1996;11(12):1952-60.
  17. Nielsen HM, Bak B, Jørgensen PH, Andreassen TT. Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand.* 1991;62(3):244-7.
  18. Andreassen T, Jorgensen P, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth Hormone Stimulates Bone Formation and Strength of Cortical Bone in Aged Rats. *J bone Miner Res.* 1995;10(7):1057-67.
  19. Bak B, Andreassen TT. The effect of growth hormone on fracture healing in old rats. *Bone.* 1991;12(3):151-4.
  20. Kidder L, Schmidt I, Evans G, Turner R. Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1997;61(4):327-35.
  21. Duarte A. Efecto de la hormona de crecimiento en el hueso viejo: análisis morfométrico y densitométrico en ratas Wistar [Internet]. universidad complutense de madrid; 2014. Disponible en: [http://eprints.ucm.es/28537/1/Trabajo Fin Master.pdf](http://eprints.ucm.es/28537/1/Trabajo%20Fin%20Master.pdf)
  22. Gómez V, Benedetti G, Castellar C, Fang L, Díaz A. Regeneración ósea guiada: nuevos avances en la terapéutica de los defectos óseos. *Rev Cubana Estomatol* [Internet]. 2014;51(2):187-94. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/est/v51n2/est07214.pdf>
  23. Sarah L. Rellenos óseos y/o injertos. *Rev Actual Clínica* [Internet]. 2012;24:1170-7. Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v24/v24\\_a09.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v24/v24_a09.pdf)
  24. Garcia O, Arredondo M. Evolución en el tratamiento de la atrofia alveolar. *Rev*

- Cubana Estomatol [Internet]. 2002;39(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072002000200008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200008)
25. Pérez A, Domínguez L, Ilisástigui Z, Hernández P. Utilización de células madre en el tratamiento de defectos óseos periodontales. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2009;46(4):108-16. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/est/v46n4/est12409.pdf>
  26. Lucheti C. «Estudio comparativo de injertos de hueso en regeneración ósea guiada. Caracterización de la respuesta frente a injertos autólogos y sustitutos de origen humano, bovino y químico» [Internet]. Universidad Nacional de la Plata; 2004. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2110/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2110/Documento_completo.pdf?sequence=1)
  27. Quintana J. Utilización de la hidroxiapatita en cirugía maxilofacial. Actualización bibliográfica. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 1998;35(1):16-20. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/est/v35n1/est03198.pdf>
  28. Peral B, Redondo L, Verrier A, Serrat A, Torres M, Vaquero C. Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. Rev esp Cir Oral y Maxilofac [Internet]. 2008;30(5):313-23. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/maxi/v30n5/cientifico.pdf>
  29. Aybar B, Bilir A, Akçakaya H, Ceyhan T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. Clin Oral Implants Res. 2004;15:119-25.
  30. Escudero N, Perea M, Campo J, Bascones A. Regeneración ósea de un defecto circunferencial de tres paredes con hueso autólogo. Av Periodoncia [Internet]. 2008;20(2):103-11. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v20n2/original2.pdf>
  31. Simion M, Fontana F, Rasperini G, Maiorana C. vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluoroethylenen membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinizedanorganic bovine bone (Bio Oss). Clin

- Oral Implant Res. 2007;18(5):620-9.
32. Pérez P. «Regeneración ósea guiada: Indicaciones, Contraindicaciones, Proceso Clínico» [Internet]. Universidad de Guayaquil; 2014. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/5254/1/PEREZpablo.pdf>
  33. López J, Chimenos E, Muñoz J, Castañeda P. Plasma rico en factores de crecimiento y regeneración ósea. DEMTUM. 2007;7(3):108-12.
  34. Beca T, Hernandez G, Morantes S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas . Una revisión bibliográfica. Av Periodoncia [Internet]. 2007;19(1):39-52. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v19n1/original4.pdf>
  35. Baez A. «Fosfato tetracalcico fraguable, hidroxiapatita sintética y la combinación entre ambos como materiales de injerto en regeneración ósea guiada» [Internet]. Universidad Nacional de la Plata; 2012. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/31292/Documento\\_completo\\_...pdf?sequence=3](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/31292/Documento_completo_...pdf?sequence=3)
  36. Olate S, Rabelo G, Jaimes M, De Albergaria J. Recuperación Ósea en Procedimientos de Reconstrucción y Colocación de Implantes. Int J Morphol. 2007;25(3):649-57.
  37. Jovani M del mar. El plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea post-exodoncia. Estudio radiográfico. [Internet]. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia; 2009. Disponible en: <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/15898/jovani.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  38. Manoochehri A, Vielma M, Castillo L. Plasma rico en plaquetas (PRP) en la regeneración ósea de alvéolos post extracción. Acta bioclinica [Internet]. 2014;4(7):85-105. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/4731/4499>
  39. Andreassen TT, Oxlund H. The effects of growth hormone on cortical and cancellous bone. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2001;2(1):49-58.
  40. Ohlsson C, Bengtsson B-A, Isaksson OGP, Andreassen TT, Słootweg MC. Growth Hormone and Bone. Endocr Rev. 1998;19(1):55-79.

41. Abduljabbar T, Kellesarian SV, Akram Z, Romanos GE, Javed F. Effect of Growth Hormone Supplementation on Osseointegration: A Systematic Review and Meta-analyses. *Implant Dent.* 2017;26(4).
42. Azriel S. Efectos terapéuticos de la hormona de crecimiento sobre el hueso. *Rev española enfermedades metabólicas óseas* [Internet]. 2000;9(3):112-6. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-reemo-70-articulo-efectos-terapeuticos-de-la-hormona-10016996>
43. Worf C. «Hormona de crecimiento y osteointegración en la cavidad oral» [Internet]. Universidad de Granada; 2007. Disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1763/1/1732418x.pdf>
44. Gómez C. «Hormona del crecimiento y melatonina en la osteointegración de implantes dentales» [Internet]. Universidad de Granada; 2009. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/18502568.pdf>
45. Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G. Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res.* 1993;273(2):279-86.
46. Ernst M, Froesch E. Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;151(1):142-7.
47. Martin-monge E, Tresguerres DDSIF, Clemente C, Tresguerres DDSJAF. Local Application of Growth Hormone to Enhance Osseointegration in Osteoporotic Bones : A Morphometric and Densitometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2017;32:751-8.
48. Ceglia A. Indicadores de maduración de la edad ósea, dental y morfológica. *Rev Latinoam Ortod y Odontopediatría* [Internet]. 2005;1-11. Disponible en: <https://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2005/art-12/>
49. Requía M, Valiati R, Hubler R, Nunes A, Antonini F, Oliveira H, et al. Effect of recombinant human Growth Hormone (rhGH) on osseointegration of titanium implants : a histological and biomechanical study in rabbits. *J Oral Implantol.* 2014;41(4).

50. Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int J Endocrinol*. 2014;1-25.
51. Sanchez J, Navarro D, Hernández A. Acción fisiopatológica integrada de las hormonas sobre el tejido óseo. *Rev Cuba Endocrinol [Internet]*. 2006;17(2). Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/end/vol17\\_2\\_06/end05206.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/end/vol17_2_06/end05206.htm)
52. Carrascosa A. Masa ósea. Factores reguladores. *Rev Española Pediatr [Internet]*. 2003;59(1):15-28. Disponible en: [http://www.seinap.es/wp-content/uploads/Revista-de-Pediatria/2003/REP\\_59-1.pdf](http://www.seinap.es/wp-content/uploads/Revista-de-Pediatria/2003/REP_59-1.pdf)
53. Reyes R, Rozas P, Muñoz M. Regulación del proceso de remodelado óseo. *Rev Esp Enfermedades Metab Oseas [Internet]*. 2008;17(1):10-4. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-reemo-70-articulo-regulacin-del-proceso-de-remodelado-13114862>
54. Nicholls AR, Holt RIG. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-1. *Front Horm Res*. 2016;47:101-14.
55. Escalante W, Castro G, Vaz L, Kuga M. Fibrina rica en plaquetas ( FRP ): Una alternativa terapéutica en odontología. *Rev Estomatol Hered*. 2016;26(3):173-8.
56. Tovar J. APLICACIÓN DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS EN LA CICATRIZACIÓN Y REGENERACION POST- EXODONCIAS DENTARIAS EN PACIENTES CON RIESGO Y CON OSTEONECROSIS MAXILAR INDUCIDA POR BIFOSFONATOS. Universidad Central de Venezuela; 2011.
57. Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, Jr RFA, Vasconcelos RC, Cavalcante RS, et al. Injectable platelet rich fibrin : cell content , morphological , and protein characterization. *Clin Oral Investig*. 2018;
58. Orozco AV, Gómez CA, Luc J, Celis M. Efectividad de los concentrados plaquetarios (PRP, PRF y PRFC) para la regeneración ósea en cirugía bucal y periodontal. Una revisión sistemática. *Rev Venez Invest Odont IADR*. 2016;4(2):253-72.
59. Shah R, Gowda M, Thomas R, Kumar T, Singh D. Biological activation of bone grafts using injectable platelet-rich fibrin. *J Prosthet Dent [Internet]*. 2018;1-3.

Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2018.03.027>

60. Páez M. «APLICACIÓN DEL PLASMA RICO EN FIBRINA EN REGENERACIÓN ÓSEA A NIVEL PERIODONTAL». Universidad Nacional de Chimborazo; 2019.
61. Miron R, Zhang Y. Autologous Liquid Platelet Rich Fibrin: a novel drug delivery system. *ACTABIo*. 2018;75:35-51.
62. De Almeida C, Valiense H, Rodriguez E, N M, Mourao F, Calasans M. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir* [Internet]. 2015;42(6). Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9657/VELOCIDAD DE CRECIMIENTO EN NINOS DE 1 A 13 ANOS DESPUES DE UN ANO DE TTO CON HC2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
63. Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr Rev*. 1987;8(4):426-38.
64. Bak B, Jørgensen PH, Andreassen TT. Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone*. 1990;11(4):233-9.
65. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gómez-Pellico L, Blanco L, Alobera MA, et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. An histologic, histomorphometric and densitometric study. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13(6):631-6.
66. Tresguerres I, Blanco L, Clemente C, Tresguerres J. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(6).
67. Tresguerres IF, Alobera M, Baca R, Tresguerres J. Histologic, Morphometric, and Densitometric Study of Peri-implant Bone in Rabbits with Local Administration of Growth Hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2005;20(2):193-202. Disponible en: [http://medlib.yu.ac.kr/eur\\_j\\_oph/ijom/IJOMI/ijomi\\_20\\_193.pdf](http://medlib.yu.ac.kr/eur_j_oph/ijom/IJOMI/ijomi_20_193.pdf)



68. Stenport VF, Olsson B, Morberg P, Törnell J, Johansson CB. Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2001;3(3):135-41.
69. Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, et al. Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial stimulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. *J Bone Miner Res.* 1998;13(4):739-48.
70. Emilov-velev K, Clemente-de-arriba C, Alobera-garcía MÁ, Sansalvador M, Loarte C. Bone regeneration in experimental animals using calcium phosphate cement combined with platelet growth factors and human growth hormone. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2015;59(3):200-10.
71. Feizbakhsh M, Razavi M, Minaian M, Teimoori F, Dadgar S, Maghsoodi S. The effect of local injection of the human growth hormone on the mandibular condyle growth in rabbit. *Dent Res J.* 2014;11(4):436-41.
72. Harris W, Heaney R, Jowsey J, Cockin J, Graham J, Weinberg E. Growth hormone: The effect on skeletal renewal in the adult dog. *Calcif Tissue Res.* 1972;10(1):1-13.
73. Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical Application of Melatonin and Growth Hormone Accelerates Bone Healing around Dental Implants in Dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(2):226-35.
74. Calvo JL, Mate J, Delgado R, Ramirez MP, Cutando A, Peña M. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: A dog study. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(6):587-93.
75. Stefani C, Machado M, Saliun E, Toledo S, Nociti H. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent.* 2000;9(2):126-31.
76. Lynch SE, Buser D, Hernandez R, Weber H, Stich H, Fox C, et al. Effects of the

- platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991;62(11):710-6.
77. Hossam A, Elghamrawy S, Osman S, Elhak A. Histological evaluation of the effect of using growth hormone around immediate dental implants in fresh extraction sockets: an experimental study. *Implant Dent.* 2011;20(1):47-55.
78. Bail H, Raschke M, Kolbeck S, Krummrey G, Windhagen H, Weiler A, et al. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone.* 2002;30(1):117-24.
79. Raschke M, Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Flyvbjerg A, Lindner T, et al. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone.* 2001;29(4):368-73.
80. Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard A, et al. Homologous growth hormone accelerates bone healing - a biomechanical and histological study. *Bone.* 2003;33(4):628-37.
81. Bail H, Klein P, Kolbeck S, Krummrey G, Weiler A, Schmidmaier G, et al. Systemic application of growth hormone enhances the early healing phase of osteochondral defects--a preliminary study in micropigs. *Bone.* 2003;32(5):457-67.
82. Velazco G, Saavedra A, Ramirez E, Gonzales A. Anadamios autologos a base de plasma gel y silicio organico en regeneración de tejidos. *Acta Bioclínica* [Internet]. 2017;7(14):100-26. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/8360/8304>
83. Infante P, Gutiérrez J, Torress D, García A, González J. Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales autólogos. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* [Internet]. 2007;29(1):7-19. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/maxi/v29n1/controversia1.pdf>
84. Zárates B, Reyes A. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir y Cir* [Internet]. 2006;74(3):217-22. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2006/cc063n.pdf>

85. Ortega O, Paredes A. Análisis comparativo de la regeneración ósea obtenida con quitosano y plasma rico en fibrina. Universidad de Los Andes; 2012.
86. Meza-mauricio EJ, Lecca M, Correa-quispilaya E, Rios K. Fibrina rica en plaquetas y su aplicación en periodoncia : revisión de literatura. Rev Estomatol Hered. 2014;24(4):287-93.
87. Choukroun J, Ghanaati S. Introducing the Low-Speed Centrifugation Concept. Platelet Rich Fibrin Regen Dent. 2017;
88. Hernandez C, Delgado A, Dominguez V. Evaluación biomecánica de un modelo de defecto óseo en tibia de rata. Rev Mex Ingenieria Biomed [Internet]. 2011;XXXII(1):12-9. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/inge/ib-2011/ib1111d.pdf>
89. Olivares O, Pineda V. REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA CON HIDROXIAPATITA FOULA , EN RATAS BIOU : WISTAR. Universidad de los andes; 2017.
90. Suarez D. Eficiencia del liposoma a base de quitosano para la regeneración ósea guiada en ratas wistar. Universidad de Los Andes; 2012.
91. Estrada C, Paz A, Lopez L. ingeniería de tejido ose: consideraciones basicas. EIA. 2006;93-100.
92. Ardila C, Martin C. Regeneración Tisular Guiada: Bases biológicas y clínicas. Parte II: fase de mantenimiento, fundamentos, establecimiento y protocolo de funcionamiento. Rev Fed Odontol Colomb. 2003;205:26-37.
93. Fernandez I, Alobera M, Del Canto M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. Rev Med oral, Patol oral y Cir bucal. 2006;11(2).
94. Plasencia J, Cuesta M, Fernandez J, Calderon J. Regeneración ósea guiada en implantología. En: Cirugia oral. 2008. p. 207-24.
95. De Almeida J, Frascino A. Regeneración ósea en el seno maxilar. Odontología Vital. 2016;24:29-34.
96. Garza M, Cepeda J. Regeneración ósea guiada de cara al año 2000. Rev ADM. 2000;4:147-53.

97. Nappe C, Baltodano C. Regeneración ósea guiada para el aumento vertical del reborde alveolar. *Rev Clin Periodoncia Implant Rehabil Oral*. 2013;6(1):38-41.
98. De la Roa M, Cepeda J. Regeneración ósea guiada de cara el año 2000 consideraciones clínicas y biológicas. *Rev ADM*. 2000;7(4):147-53.
99. Machin J. *Ciencia y Técnica en Implantología inmediata*. 1era edici. Ripano, editor. Madrid; 2007.
100. Gurbuzer B, Pikdoken L, Tunali M, Urhan M. Scintigraphic Evaluation of Osteoblastic Activity in Extraction Sockets Treated With Platelet-Rich Fibrin. *Am Assoc Oral Maxillofac*. 2009;
101. Garcia H. *Aplicación de Fibrina Rica en Plaquetas posterior a extracciones dentarias*. 2010.
102. Sunitha V, Munirathnam E. Evolución de una segunda generación de concentrados plasmáticos. *Rev Indian J Dent Res*. 2008;19:42-6.
103. Salgado-peralvo ÁO, Salgado-garcía Á, Arriba - Fuente L. Nuevas tendencias en regeneración tisular: fibrina rica en plaquetas y leucocitos. *Rev Española Cirugía Oral y Maxilofac* [Internet]. 2016;39(2):91-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.maxilo.2016.03.001>
104. Schwartz A, Martinez G, Lamberto. Factores de crecimiento derivados de plaquetas y sus aplicaciones en medicina regenerativa. Potencialidades del uso del ozono como activador. *Rev Española Ozonoterapia*. 2011;1(1).
105. Tiong A, Freedman S. Gene therapy for cardiovascular disease: The potential of VEGF. *Curr Opin Mol Ther*. 2004. 151-159 p.
106. Reyes M, Montero S, Cifuentes J, Zarzar E. Extraction Technique and Surgical Use of the Plasma Rich in Growth Factors (P.R.G.F.). *Rev Dent Chile*. 2009;93(2):26.
107. Anitua E. La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia (PRGF). *RCOE*. 2001;6(3).
108. Torres J. *Influencia del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea: estudio densitométrico y morfométrico en calota de conejas osteoporóticas*. Universidad Rey Juan Carlos España; 2006.

109. Bocanegra M. Osteonecrosis de los maxilares asociada a bisfosfonatos. Las Palmas de Gran Canaria- España; 2010.
110. Jasmine S, Thangavelu A, Janarthanan K, Krishnamoorthy R, Alshatwi AA. Antimicrobial and antibiofilm potential of injectable platelet rich fibrin — a second-generation platelet concentrate — against biofilm producing oral staphylococcus isolates. Saudi J Biol Sci [Internet]. 2019;xxx(xxxx). Disponible en: <http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/1147/1/435511.pdf>
111. De la Rosa A. Efecto de la Hormona del Crecimiento y Los Estrógenos en el hueso osteoporótico: Análisis Morfométrico en ratas Wistar. Estudio piloto. Universidad Complutense de Madrid; 2018.
112. Requia M. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NO PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO - ESTUDO EXPERIMENTAL E REVISÃO DE LITERATURA [Internet]. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL; 2011. Disponible en: <http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/1147/1/435511.pdf>
113. Arciniegas L. EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO EN NIÑOS DE 1 A 13 AÑOS, CON DIAGNOSTICO DE DEFICIT DE HORMONA DE CRECIMIENTO, PEQUEÑO PARA LA EDAD GESTACIONAL, SINDROME DE PRADERWILLI Y SINDROME DE TURNER TRATADOS CON HORMONA DE CRECIMIENTO RECOMBINANTE HUMANA. Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2015.
114. Gonzalez I, Coral A. SEGURIDAD DEL TRATAMIENTO CON HC: RHGH Y CANCER. Rev Endocrinol. 2015;
115. Kakabadse D. Actividad de la Hormona de Crecimiento en el Desarrollo de Enfermedades Autoinmunes. Universidad Autónoma de Madrid; 2013.
116. Costa C. Estudio mediante animales transgenicos de papel de la hormona de crecimiento y el IGF-I en el desarrollo de diabetes mellitus [Internet]. Universidad Autonoma de Barcelona; 1995. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3619/TCCV1de3.pdf?sequence=1>

&isAllowed=y

117. Hurtado J. El proyecto de investigación. Metodología de la Investigación Holística. 4ta edició. 2006.
118. Molina F. Efecto del plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) en la regeneración de tejidos blandos y tejido óseo. Estudio experimental en conejos albinos de Nueva Zelanda. Universidad de Murcia; 2008.
119. Castillo L. Efectividad del plasma rico en plaquetas sobre la regeneración ósea: estudios en animales de laboratorio. Universidad de Los Andes; 2009.
120. Cuesta L, Sanchez K. Aspectos éticos de la experimentación con animales. *cbioetica* [Internet]. 2007; Disponible en: <http://cbioetica.org/revista/72/722527.pdf>
121. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnologia e innovación FONACIT. Código de ética para la vida [Internet]. 2011. Disponible en: [https://www.mppeuct.gob.ve/sites/default/files/descargables/reglamento\\_locti\\_2010.pdf](https://www.mppeuct.gob.ve/sites/default/files/descargables/reglamento_locti_2010.pdf)
122. Navarro J, Ramirez R, Villagran C. Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. 1.<sup>a</sup> ed. Mexico; 2012.
123. Martínez C. Estadística y Muestreo. Decimo seg. EDICIONES E, editor. 2005.
124. Gutierrez H, De la vara R. Análisis y diseño de experimentos [Internet]. 2da edició. Interamericana Mcg-H, editor. Mexico; 564 p. Disponible en: <http://biblioteca.soymercadologo.com/wp-content/uploads/2016/05/Análisis-y-Diseño-de-Experimentos-2ed-Gutiérrez-Pulido.pdf>
125. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets* [Internet]. 2017;0(0):1-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2017.1293807>
126. Ghanaati S, Booms P, Orłowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advance platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implant.* 2014;40(6):689-89.

127. Fujioka M, Miron R, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y. Optimized platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol*. 2017;88(1):112-21.
128. Harms C, Helms J, T T, Stratos I, Ignatius A, Gerber T, et al. Osteogenic capacity of nanocrystalline bone cement in a weight-bearing defect at the ovine tibial metaphysis. *Int J nanomedicine*. 2012;7:2883-9.
129. Yopez J, Ortiz R, Velazco G, Gonzalez A. Resultados de la osteointegración con hidroxiapatita coralina tratada térmicamente: análisis ultraestructural en ratas Sprague Dawley. *Acta Bioclínica*. 2015;5(10):125-39.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ANEXOS

### 3.3 Ficha de recolección de datos histológicos

Grupo A. EXPERIMENTAL Semana 3	N°	TEJIDO DE GRANULACIÓN				TEJIDO FIBRO-CONECTIVO				HUESO INMADURO				HUESO INMADURO				CUERPO EXTRAÑO				
		A	E	M	A	A	E	M	A	A	E	M	A	A	E	M	A	A	E	M	A	
Grupo A. EXPERIMENTAL Semana 3	1																					
	2																					
	3																					
	4																					
	5																					
	6																					
	7																					
Grupo B. EXPERIMENTAL Semana 6	8																					
	9																					
	10																					
	11																					
	12																					
	13																					
	14																					
Grupo C EXPERIMENTAL Semana 9	15																					
	16																					
	17																					
	18																					
	19																					
	20																					
	21																					
Gr D C-C	CC1																					
	CC2																					

A: Ausente    E: Escaso    M: Moderado    A: Abundante



### 3.4 Ficha de recolección de datos radiográficos

Ficha de evaluación radiográfica						
Regeneración ósea cualitativa			Regeneración ósea cuantitativa			
Momento	Ratas #	0.Defecto radiolúcido 1.Relleno oseo limitado. 2.Relleno oseo parcial. 3. Relleno oseo completo.	Medida inicial en mm2	Medida final en 2mm	Regeneración ósea obtenida	Porcentaje de regeneración ósea obtenida
	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					