

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**



**Evaluación *in vivo* de Gel de Matriz Extracelular para  
Regeneración Ósea en Calota de Rata**

Que Presenta:

**CD. Karyna Micaela Valdez Sandoval**

Directores de Tesis:

**Dr. Rosalío Ramos Payan**

**Dr. Jesús Eduardo Soto Sainz**

Diciembre 2017, Culiacán, Sinaloa, México.

## DEDICATORIA

Este trabajo de tesis va dedicado a mis padres **Julio Cesar Valdez** y **Lourdes Karyna Sandoval**, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difícil del posgrado, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho por mí, los amo.

A mi hermano, tíos, primos, abuelos, suegros y amigos.

Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A mi esposo **Alejandro Beltrán** tu ayuda ha sido fundamental, has estado conmigo incluso en los momentos más turbulentos. Este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían.

Te lo agradezco muchísimo, amor. Te amo.

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco al Posgrado de Endodoncia de la Universidad Autónoma de Sinaloa por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas para poder estudiar la especialidad.

A la Dra. Yolanda Castro por su gran labor de coordinar, apoyar y supervisar las actividades orientadas a elevar la calidad del posgrado.

Agradezco también a mis directores de tesis, el Dr. Rosalío Ramos Payan y al Dr. Jesús Eduardo Soto Sainz por su dedicación, enseñanzas y apoyo para realización de este trabajo.

A mis asesores de tesis, el Dr. José Geovanni Romero Quintana, Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina, por su asesoría y apoyo incondicional durante la realización de esta tesis, al Dr. Julio Basurto por su gran apoyo para el análisis histológico.

A los doctores que me han formado tanto en lo académico como en lo clínico, Dr. Alfredo Ayala, Dra. Itzel Castro, Dra. Ilsa Márquez, Dr. Omar Cazares, Dr. Andrés Hach, Dr. Fernando Beltrán, Dr. Basurto, Dra. Marina Urías.

A la Dra. Margarita Castro y Adilene Bojórquez por hacer la clínica más amena y divertida.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Microbiología, Jorge, Erik, Naranjo, Ruy, Geraldine y Mariana por compartir su conocimiento, dedicación y esfuerzo.

A mis compañeras, amigas y hermanas, mis EndoSister's quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías, tristezas, desvelos y un sin fin de palabras, gracias por siempre estar durante todo este tiempo. Las quiero mucho.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Erika de Lourdes Silva Benítez** por su importante aporte y participación en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis y además ha significado el surgimiento de una sólida amistad.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
1 RESUMEN .....	1
2 INTRODUCCIÓN .....	3
3 MARCO TEÓRICO .....	5
3.1 Regeneración Ósea .....	5
3.1.1 Reparación Ósea.....	6
3.1.2 Materiales usados como injerto óseo .....	7
3.1.3 Autoinjerto: Hueso Autólogo .....	8
3.2 Biomateriales .....	9
3.2.1 Hidroxiapatita.....	11
3.3 Matriz Extracelular.....	12
3.3.1 Hidrogeles de MEC.....	14
3.4 Modelos de regeneración ósea .....	15
3.4.1 Modelo de defecto en calvaria.....	15
4 ANTECEDENTES .....	18
5 JUSTIFICACIÓN .....	21
6 OBJETIVOS .....	22
6.1 OBJETIVO GENERAL .....	22
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
7 MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
7.1 Lugar de Obtención de las muestras .....	23
7.2 Tipo de estudio.....	23

7.3	Modelo de estudio.....	23
7.4	Muestra .....	24
7.4.1	Tamaño de muestra.....	24
7.4.2	Criterios de inclusión .....	24
7.4.3	Criterios de Eliminación .....	24
7.5	Metodología .....	25
7.5.1	Obtención de los materiales a evaluar.....	25
7.5.2	Obtención de la matriz extracelular descelularizada.....	25
7.5.3	Caracterización del gel .....	27
7.5.4	Procedimiento.....	27
7.5.5	Análisis Radiográfico .....	33
7.5.6	Análisis Histológico.....	33
7.6	Lugar de realización .....	34
7.7	Financiamiento.....	34
8	RESULTADOS.....	35
8.1.1	Evaluación Macroscópica .....	35
8.1.2	Evaluación Radiográfica .....	35
8.1.3	Evaluación Histológica.....	37
9	DISCUSIÓN .....	51
10	CONCLUSIÓN.....	53
11	PERSPECTIVAS .....	54
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación, origen y propiedades de materiales para aumento óseo.....	7
Tabla 2. Localizaciones para la obtención de injerto óseo autógeno .....	8

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Rata Wistar .....	23
Figura 2 Vejigas porcinas .....	26
Figura 3. Mesa de trabajo e instrumental. ....	28
Figura 4. Técnica de inyección intramuscular. ....	29
Figura 5. Toma de radiografía con Radiovisiógrafo RVG 5010 Kodak.....	29
Figura 6. Creando el defecto con fresa trepanadora. ....	30
Figura 7. Defecto óseo. ....	31
Figura 8. Colocación implante. ....	32
Figura 9 Fotografías al momento de realizar el sacrificio del modelo experimental de cada grupo: .....	35
Figura 10. Radiografías representativas del Grupo Control Negativo y Control Positivo.....	36
Figura 11 Radiografías representativas del Grupo Gel de MEC y Gel de MEC con HAp. ....	37
Figura 12. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 12 semanas con tinción H&E.....	39
Figura 13. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 12 semanas con tinción Rojo de Alizarina. ....	41
Figura 14. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 12 semanas con tinción Tricrómica de Masson.....	43
Figura 15. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 16 semanas con tinción H&E.....	45
Figura 16. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 16 semanas con tinción Rojo de Alizarina. ....	47
Figura 17 Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 16 semanas con tinción Tricrómica de Masson. ....	49

# 1 RESUMEN

**Introducción:** La matriz extracelular (MEC) es una mezcla compleja de proteínas estructurales y funcionales dispuestas tridimensionalmente, que la convierten en un andamio adecuado para regeneración tisular. Su efectividad en la regeneración de diferentes tejidos ha sido evaluada con éxito, sin embargo, hay pocos estudios en regeneración ósea. **Objetivo:** Evaluar *in vivo* un gel de matriz de vejiga porcina para regeneración ósea en calota de rata. **Materiales y Métodos:** Se realizó un defecto crítico en calota de 16 ratas adultas Wistar hembras. Grupo 1 (n=6) se colocó gel de MEC, Grupo 2 (n=6) se colocó gel de MEC con HAp, Grupo 3 (n=2) se colocó autoinjerto, Grupo 4 (n=2) se usó como control negativo (sin tratamiento). Se realizó evaluación macroscópica, radiográfica e histológica a las 12 y 16 semanas del acto quirúrgico. **Resultados:** Se observó una mayor regeneración ósea en el grupo de Gel de MEC comparado con los demás grupos. **Conclusiones:** La regeneración ósea inducida por el gel de MEC de vejiga porcina presenta mejores evidencias de regeneración ósea macroscópica, radiográfica e histológicamente.

**Palabras claves:** Matriz Extracelular, regeneración, gel.

## 2 ABSTRACT

**Introduction:** The extracellular matrix (ECM) is a complex mixture of structural and functional proteins arranged three-dimensionally, which make it an adequate scaffold for tissue regeneration. Its effectiveness in the regeneration of different tissues has been evaluated successfully, however, there are few studies in bone regeneration.

**Objective:** Evaluate *in vivo* a porcine bladder matrix gel for bone regeneration in rat calvarial. **Materials and Methods:** A critical defect was made in the calvarial of 16 female Wistar adult rats. Group 1 (n = 6) was placed MEC gel, Group 2 (n = 6) was placed MEC gel with HAp, Group 3 (n = 2) was placed autograft, Group 4 (n = 2) was used as control negative (without treatment). Macroscopic, radiographic and histological evaluation was performed at 12 and 16 weeks after surgery. **Results:** A greater bone regeneration was observed in the MEC gel group compared with the other groups. **Conclusions:** The bone regeneration induced by the MEC gel of porcine bladder presents better evidence of macroscopic, radiographic and histological bone regeneration.

**Keywords:** Extracellular matrix, regeneration, gel.

### 3 INTRODUCCIÓN

Cuando un tejido del cuerpo humano sufre un daño estructural, pueden ocurrir tres fenómenos; puede ser que el tejido sufra un proceso de necrosis con pérdida del mismo: reparación, en donde se produce la restauración de dicho tejido sin que éste conserve su arquitectura original ni tampoco su función (tejido cicatricial); o puede experimentar un fenómeno de regeneración originándose un nuevo tejido que posee todas las propiedades indistinguibles del tejido original (A. Lang, Karring, 2005). El objetivo terapéutico, una vez que se produce el daño tisular, será la regeneración.

En el tejido óseo, encontrar algún tipo de injerto o material para sustituir su pérdida ha sido el propósito de investigaciones en los últimos años. Distintos sustitutos óseos han sido utilizados en el área de la salud para tratar la reconstrucción de defectos óseos. Por otro lado, la limitada disponibilidad y morbilidad asociada a las técnicas de obtención de injerto óseo autólogo, considerado como el “estándar de oro” de los injertos óseos, ha incrementado el interés por desarrollar nuevos materiales que suplan las necesidades del tejido óseo autólogo y brinden todas sus ventajas (Burchardt, 1983).

Los materiales o injertos tienen distintas propiedades; osteogénesis el cual es un proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo; osteoinducción proceso de formación de hueso durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y la reparación en tejidos donde originalmente no existe, la regeneración ósea se trata del proceso de estimulación de la osteogénesis y osteoconducción que consiste en la creación de un andamio o matriz física apropiada para la entrada de osteoblastos precursores en el defecto. Este proceso suele continuarse con la reabsorción progresiva del material injertado (B. Lang, Karring, 2000) (Anitua, 2000).

Se busca que estas tres propiedades las presente un injerto óseo ideal, además de ser biocompatible.

Los biomateriales naturales y las matrices de tejido acelular presentan una mejor biocompatibilidad y biodegradabilidad (Guo, Su, Wei, Kong, & Liu, 2009).

Los injertos óseos desarrollados actualmente buscan imitar la conformación tridimensional y altamente porosa de la matriz extracelular. Por lo tanto en este estudio utilizamos MEC de vejiga porcina en hidrogel y evaluar su potencial regenerativo en tejido óseo.

## 4 MARCO TEÓRICO

### 4.1 Regeneración Ósea

El tejido óseo es uno de los más dinámicos del organismo, reconociéndose una serie de actividades biológicas atribuibles al sistema esquelético: crecimiento, regeneración, modelado y remodelado (Anitua, 2000).

Las estrategias de las que disponemos para conseguir la regeneración tisular ósea se basan en la utilización de biomateriales artificiales o naturales, y proteínas que aporten las señales estimuladoras que desencadenen los acontecimientos necesarios para la regeneración. La médula ósea es una fuente de células precursoras con capacidad de diferenciación en distintos tipos celulares: osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, mioblastos y adipocitos. Se ha demostrado la importancia de los factores de crecimiento y de las proteínas morfogenéticas (BMPs) en los procesos de proliferación, diferenciación y migración celular. Las células osteoprogenitoras se dividen en determinadas e inducibles como precursoras osteogénicas; las primeras poseen una capacidad intrínseca para proliferar y diferenciarse a osteoblastos, y se ubican en la médula ósea, endostio y periostio; mientras que las células inducibles son células mesenquimáticas en otros tejidos u órganos, que mediante estímulos específicos pueden convertirse en células formadoras de hueso. Las células osteoprogenitoras principales son los pericitos (células perivasculares de forma estrellada), pertenecientes a los vasos que penetran en la masa ósea durante su formación (A. Lang, Karring, 2005).

Existen tres mecanismos relacionados con una regeneración ósea exitosa: la osteogénesis, la osteoinducción y la osteoconducción.

**Osteogénesis:** Es el proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo. Los osteoblastos vivos son trasladados desde otras zonas del organismo hacia el lugar donde se necesitan. Este mecanismo es el que se observa en los injertos de hueso

autólogo, en donde se establece una actividad de remodelado, que simultáneamente lleva a la reabsorción del material injertado y reemplazo por hueso neoformado, para llegar a conseguir la incorporación total del injerto (Anitua, 2000).

**Osteoinducción:** Es el proceso de formación de hueso durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y la reparación en tejidos donde originalmente no existe. Se trata del proceso de estimulación de la osteogénesis. Se produce gracias a la liberación de proteínas osteoinductivas (BMPs) que favorecen la diferenciación celular, haciendo posible la transformación del tejido conectivo (fibroblastos) en cartílago (condroblastos y condrocitos) que posteriormente será calcificado, invadido por vasos y finalmente reemplazado por hueso (Anitua, 2000).

**Osteoconducción:** Consiste en la creación de un andamio o matriz física apropiada para la entrada de osteoblastos precursores en el defecto. Este proceso suele continuarse con la reabsorción progresiva del material injertado (B. Lang, Karring, 2000) (Anitua, 2000).

#### **4.1.1 Reparación Ósea**

El hueso es un tejido que tiene la capacidad de restaurar su estructura original, y así cualquier lesión ósea mediante osteoinducción, ya sea por células óseas o por células próximas a la lesión, mediante factores de crecimiento y factores de inducción ósea como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Las BMPs inducirán la diferenciación de células osteoprecursoras (de periostio, endostio y espacios medulares) en osteoblastos que promuevan la formación de hueso. Esta capacidad de regeneración ósea tiene ciertas limitaciones, por lo que en los casos de poca vascularización, inestabilidad mecánica, defectos demasiados grandes o competencia con tejidos inhibidores, puede fallar (Mattout, 2007). De manera que para lograr el éxito en la regeneración ósea se requerirá previamente que exista el aporte de células osteoformadoras o células con la capacidad de diferenciarse en ellas, que estén presentes estímulos osteoinductores para iniciar la diferenciación de

las células mesenquimáticas en osteoblastos, y que exista un medio osteoconductor, que forme un andamio sobre el cual el tejido invasor pueda proliferar, y en el que las células osteoprogenitoras estimuladas puedan diferenciarse en osteoblastos para formar hueso (B. Lang, Karring, 2000).

#### 4.1.2 Materiales usados como injerto óseo

Entre los medios para mejorar el sustrato óseo destacan los injertos óseos que pueden proceder del mismo individuo, de otro de la misma especie o de diferente especie (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación, origen y propiedades de materiales para aumento óseo**

<b>MATERIAL</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>CAPACIDAD</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
Autoinjerto	Hueso de la misma persona	Osteogénica	Morbilidad zona donante
Alloinjerto DFDBA: hueso deshidratado congelado desmineralizado FDBA: hueso deshidratado congelado	Hueso de la misma especie, pero diferente individuo	Osteogénica Osteoinductiva Osteoconductiva	Riesgo de transmisión de enfermedades
Xenoinjerto	Hueso de otra especie	Osteoconductiva	Riesgo de transmisión de enfermedades
Biomateriales Alopásticos	Material inerte	Osteoconductiva	Encapsulamiento

### 4.1.3 Autoinjerto: Hueso Autólogo

Desde la perspectiva exclusiva de crecimiento óseo, el mejor injerto es el de hueso autólogo ya que sus propiedades engloban los tres mecanismos implicados en la regeneración ósea ideal (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), puesto que proporciona células óseas, proteínas osteoinductivas como factores de crecimiento y BMPs, así como una importante matriz de soporte.

La actividad osteogénica está dominada por las células óseas mediante la formación de tejido osteoide; sin embargo no son sólo las células óseas del injerto las que contribuyen a la formación del hueso, ya que casi ninguna de ellas sobrevive al trasplante, sino que el injerto será invadido por células mesenquimales que después se diferenciarán a osteoblastos (Karring, 2000). El injerto también sufre una remodelación que conlleva, durante la fase de reabsorción, la liberación de factores de crecimiento y BMPs procedentes de la matriz, favoreciendo la osteoinducción. La estructura ósea del injerto, actúa como matriz del hueso neoformado, permitiendo el efecto osteoconductor.

El hueso autólogo se puede obtener de varias localizaciones, dependiendo de la cantidad y calidad del hueso que se quiera injertar (Tabla 2).

**Tabla 2. Localizaciones para la obtención de injerto óseo autógeno**

LOCALIZACIÓN	ZONAS ANATÓMICAS
Extraoral	Cresta iliaca Calota Tibia
Intraoral	Mentón Rama ascendente mandibular Tuberosidad del maxilar

## 4.2 Biomateriales

Un biomaterial se define como: "un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o substituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo" según la "Segunda Conferencia para el Consenso de definiciones en Biomateriales", que tuvo lugar en el Reino Unido en 1992 (Gil, 2002).

Un área de interés para la ingeniería tisular es el desarrollo de materiales que contribuyan en los procesos de regeneración ósea. Estos son necesarios pues las patologías óseas representan una proporción importante de las causas de incapacidad física sin importar la condición de las personas.

En un principio, en el enfoque dado a los biomateriales usados para la regeneración ósea solo se buscaba aplicar o desarrollar materiales capaces de soportar los esfuerzos mecánicos que originalmente debía soportar el hueso dañado y que no provocaran una reacción de rechazo por parte del organismo en el que se implantaban. En esta categoría de materiales encontramos metales como los aceros inoxidables y aleaciones de titanio en los sistemas de fijación de huesos con fracturas. Sin embargo, estos sistemas tienen el inconveniente de que requieren intervenciones quirúrgicas para su extracción luego del tratamiento, lo que implica mayores costos y potencializa la infección. Además, todo material que se inserta en un tejido vivo provoca una respuesta, aunque sea leve, por parte de éste.

En las últimas décadas se han desarrollado biomateriales que cumplen con requerimientos específicos en diferentes aplicaciones clínicas. Autores como Ikada (2006), Meyer U (2009), Catalina Estrada (2006) y Barrère, Mahmood, Groot, and Blitterswijk (2008) describen que los materiales para implantes óseos deben observar las siguientes propiedades:

**Biocompatibilidad.** Los materiales deben integrarse al organismo hospedero sin que haya efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmunológica. Esta es una propiedad fundamental de los biomateriales.

**Biodegradabilidad.** Degradación (mediante hidrólisis) a tasas que sean lo más cercanas posibles a las tasas de formación de nuevo hueso. Esto constituye un reto a la biocompatibilidad debido a que los productos de degradación no deben ser tóxicos.

**Resistencia y compatibilidad mecánica.** Las propiedades mecánicas como el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción, a la fractura, a la fatiga y porcentaje de elongación, entre otros, deben ser lo más cercanas posibles a las del tejido que se reemplaza (compatibilidad mecánica) para evitar osteopenia.

**Osteoinductividad.** Promoción de la formación de células específicas del tejido óseo. Esto se logra reclutando células madre mesenquimales y osteoprogenitoras para que posteriormente proliferen y se diferencien hacia la línea osteogénica.

**Osteoconductividad.** Esta propiedad se refiere a la actuación del material como soporte estructural en la formación y crecimiento de nuevo hueso. Esta propiedad se combina con la biodegradabilidad pues el material del implante debe ser reabsorbido para dar espacio al nuevo tejido que inicialmente ayudó a soportar.

**Radiolucidez.** El material debe diferenciarse radiográficamente con respecto al tejido donde se implantó.

El desarrollo de la ingeniería de tejidos en el área de biomateriales exhibe materiales que cumplen en mayor o menor grado estas propiedades. Existen familias de materiales con características que los hacen útiles para un rango específico de aplicaciones clínicas: por lo que, según sea la aplicación, se debe seleccionar el biomaterial. Los materiales del andamio se clasifican según sean metálicos,

cerámicos, poliméricos u orgánicos. Puede haber materiales compuestos como cerámico-metal o cerámico-polimérico. También pueden clasificarse en sólidos o hidrogeles (si el contenido de agua es mayor al 30 %).

Hench and Polak (2002), dividieron el desarrollo de los biomateriales en tres generaciones: la primera fue desarrollada entre 1960-1970 la cual constaba de biomateriales “inertes”, teniendo como objetivo lograr una combinación adecuada de las propiedades físicas, generando una respuesta tóxica mínima en el hospedero (Hench & Polak, 2002). El campo de los biomateriales cambió su énfasis y en vez de lograr una respuesta bioinerte se empezaron a producir componentes bioactivos los cuales podían provocar una acción controlada y una reacción en un ambiente fisiológico, fue cuando se les denominó de segunda generación. A mediados de 1980 comenzaron a utilizarse cerámicas sintéticas de hidroxiapatita, biomateriales de tercera generación, los cuales están diseñados para estimular respuestas celulares específicas a nivel molecular con una conformación tridimensional altamente porosas, imitando los componentes de la matriz extracelular.

#### **4.2.1 Hidroxiapatita**

La hidroxiapatita de calcio  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HAp) es un material ampliamente utilizado en biomedicina, para la fabricación de implantes óseos, debido a su biocompatibilidad. La HAp también tiene aplicación para la protección ambiental, ya que se puede emplear en la eliminación de metales; por otra parte, tiene la capacidad de absorber eficazmente moléculas orgánicas de su superficie (Piccirillo & PM, 2017).

La HAp puede presentar dos posibles estructuras, ya que puede ser monoclinica o hexagonal (grupos espaciales  $\text{p}2_1/b$  y  $\text{P}6_3/m$ , respectivamente); la forma más común es la hexagonal.

La HAp hexagonal es el componente principal de los huesos humanos y animales (Figueiredo et al., 2010); debido a esto, la HAp sintética se utiliza ampliamente en la biomedicina. Su composición y comportamiento es similar a la del hueso humano; por lo tanto, se utiliza para la fabricación de injertos óseos (Boutinguiza et al., 2012). La HAp es muy biocompatible y es osteoconductora, ya que favorece la formación de hueso nuevo a través del crecimiento de osteoblastos (Haider, Haider, Han, & Kang, 2017).

### **4.3 Matriz Extracelular**

La matriz extracelular está compuesta de colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas. Cada uno de estos componentes tiene funciones importantes durante el desarrollo embrionario (Brown, 2011; Swinehart & Badylak, 2016).

La matriz extracelular (MEC) está formada por los productos secretados por las células residentes de los tejidos y órganos; sus moléculas representan una mezcla diversa de proteínas estructurales y funcionales, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y otras moléculas dispuestas en una ultraestructura única para cada localización anatómica. Existe un estado de reciprocidad dinámica entre la MEC y las células residentes. Por lo tanto, la composición de la matriz, el cambio de organización como su función de adaptación metabólica de las células en respuesta a los cambios en las propiedades mecánicas, pH, concentración de oxígeno, y otras variables del microambiente (Bissell, Hall, & Parry, 1982). Esta relación estructura-función de adaptación constante, representa el andamio ideal para la población de células residentes.

La matriz extracelular proporciona un soporte estructural de tres dimensiones que ocupa el espacio entre las células, es un sustrato que favorece la migración celular, y es un transmisor de fuerzas biomecánicas. Las propiedades físicas de la MEC, tales como la rigidez, porosidad, insolubilidad y la topografía que se derivan de la

composición de la matriz determinan en gran medida el comportamiento mecánico de cada tejido individual, así como el comportamiento de las células que residen en su interior (Daley, Peters, & Larsen, 2008; Lu, Takai, Weaver, & Werb, 2011).

Gracias a sus propiedades versátiles, la MEC derivada de tejidos descelularizados ha sido estudiada ampliamente como una fuente de andamios biológicos para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Hasta el momento, muchos estudios se han enfocado en la descelularización de tejidos y órganos, incluyendo la submucosa del intestino delgado, piel, ligamentos, vejiga urinaria, corazón y pulmón (Bolland et al., 2007; Xiong & Wan, 2008).

En la actualidad hay estudios en los que se ha comprobado que la matriz de la vejiga urinaria presenta propiedades biológicas superiores y es considerado un bioandamio excelente para la regeneración tisular. La matriz de la vejiga urinaria contiene gran variedad de glucosaminoglicanos, incluida la heparina, heparán sulfato, sulfato de condroitin y ácido hialurónico. Algunos reportes sugieren que ésta puede proveer un buen soporte para la regeneración tisular (Atala, Bauer, Soker, Yoo, & Retik, 2006).

Lo que hace diferente esta MEC de las obtenidas de otros órganos, es que tiene una mayor cantidad de fibronectina, colágena tipo IV, laminina, enactina y glucosaminogilicanos, y hasta el momento ha mostrado excelentes capacidades en la reconstrucción, formación de músculo liso inervado y organizado (Badylak, 2002).

Se ha descrito que la MEC de vejiga es un material que conserva inalterada su arquitectura a base de colágena comparada con el tejido completo (a excepción de la colágena tipo III) y que los cambios en las propiedades mecánicas son mínimos y esto se relaciona con el hecho de que se conservan las principales proteínas estructurales (colágeno y elastina) (Farhat et al., 2008).

Debido a lo anterior, se afirma que la MEC formada a partir de vejiga urinaria presenta propiedades biológicas muy superiores a la de otros órganos y puede funcionar como un andamio ideal para reconstrucción en un futuro (Liu et al., 2011).

#### **4.3.1 Hidrogeles de MEC**

Un hidrogel es un material polimérico altamente hidratado, el cual mantiene la integridad estructural mediante redes físicas y químicas entre cadenas poliméricas. Las cadenas poliméricas pueden ser sintéticas o naturales. Los hidrogeles sintéticos y naturales han sido ampliamente utilizados para llenar el espacio creado en el tejido óseo por infecciones o traumatismos, y suministrar moléculas/fármacos bioactivos o células para estimular el crecimiento del tejido (Drury & Mooney, 2003).

Muchos hidrogeles se han derivado de componentes de matriz extracelular (MEC) tales como colágeno, ácido hialurónico y elastina o mezclas complejas de proteínas de la MEC tales como matrigel. Hasta la fecha, los hidrogeles de MEC se han utilizado principalmente como modelos de cultivo organotípico en 3 dimensiones para estimular el crecimiento del tejido después de la lesión. El descubrimiento de que la MEC podría transformarse en hidrogeles expandió su potencial *in vitro* y la utilidad *in vivo* (Voytik-Harbin SL, 1998).

Muchos de los hidrogeles investigados tienen polímeros sintéticos con una estructura química definida y propiedades mecánicas aptas para la aplicación clínica, sin embargo, hay un número de recientes descripciones de los hidrogeles inyectables derivados de materiales biológicos naturales, los cuales poseen una biocompatibilidad y bioactividad superior comparada con sus contrapartes sintéticos.

## 4.4 Modelos de regeneración ósea

Los modelos experimentales de regeneración ósea más establecidos son los de fractura y los modelos de osteoinducción u osteointegración con biomateriales, por su capacidad de transferencia a la práctica clínica (Holstein et al., 2009; Nunamaker, 1998).

### 4.4.1 Modelo de defecto en calvaria

Tras una lesión traumática, el grado de reparación ósea depende del tamaño del defecto óseo y de la localización de la lesión. En el caso de defectos críticos, es decir defectos que no se reparan completamente de forma espontánea, se utilizan biomateriales para rellenar la cavidad generada en el tejido óseo dañado o estabilizar el defecto estimulando la actividad y/o proliferación celular. Así pues, este tipo de modelos experimentales se llevan a cabo en fémures o tibias de ratas, conejos o perros (Pearce, Richards, Milz, Schneider, & Pearce, 2007) en los que se provoca el defecto cavitario con una fresadora de velocidad media. Normalmente, este tipo de defectos se producen de forma sencilla y rápida, por lo que la intervención quirúrgica presenta una escasa incidencia de complicaciones infecciosas en los animales de experimentación. Además, no compromete la continuidad del hueso y la técnica quirúrgica es fácilmente reproducible (Katthagen, 2012).

La regeneración *in vivo* de médula para la curación de defectos de tamaño crítico de la bóveda craneal es un área de investigación activa en curso. Los médicos y los científicos están generando nuevos métodos y tratamientos de combinación para tratar defectos craneales. Los modelos animales tienen las limitaciones de la recreación de defectos craneales reducidos, pero son nuestra mejor opción disponible actualmente. En primer lugar nos centraremos en la descripción de los modelos de animales pequeños y posteriormente describiremos de manera breve los modelos de animales más grandes que se utilizan con menos frecuencia (Katthagen, 2012).

#### 4.4.1.1 Modelos animales-pequeños

##### 4.4.1.1.1 *Ratón.*

El ratón es actualmente el modelo animal más utilizado en la investigación científica básica, debido a su facilidad de mantenimiento y costo relativamente bajo. Además, las herramientas de análisis de biología molecular y celular son sofisticadas, fácilmente disponibles y producen resultados altamente reproducibles. En el ratón, un defecto craneal de tamaño crítico se define como un déficit óseo mayor o igual a 5 mm. Tal defecto, si no se trata, no se cura en la vida de un animal. En general, un defecto de tamaño crítico en la bóveda craneal de ratón se crea mediante el uso de un trépano que hace un defecto circular en el esqueleto craneal. El reto en la utilización de este modelo en particular es el pequeño tamaño del ratón. Debido a la relación íntima de la corteza cerebral, la duramadre y la bóveda craneal, una craneotomía preservando la dura madre es técnicamente difícil.

Para preservar la duramadre, las craneotomías en ratones se deben realizar con la ayuda de un microscopio de disección. La otra opción, por supuesto, es utilizar un modelo animal más grande, como la rata.

##### 4.4.1.1.2 *Rata.*

La rata es otro modelo animal comúnmente usado para el estudio de defectos de tamaño crítico. En la rata, un defecto craneal de tamaño crítico se define como un déficit óseo mayor que o igual a 8 mm. En 1982, Takagi, y Urist determinaron el diámetro de 8 mm de defectos craneales en ratas Sprague-Dawley curadas a 5 mm por 4 y 12 semanas. Sin embargo, los primeros en examinar los defectos críticos del tamaño de la rata fueron Freeman y Turnbull 10 años antes. Los beneficios de la rata sobre un animal más pequeño para estudiar los defectos craneales son su mayor

tamaño y la consecuencia de que uno puede realizar craneotomías técnicamente sanas (Szpalski, Barr, Wetterau, Saadeh, & Warren, 2010).

## 5 ANTECEDENTES

Bosch y col, realizaron un estudio para determinar si un defecto de la bóveda craneal de 5 mm en ratas adultas cumple los requisitos de un defecto óseo de tamaño crítico y evaluar la reparación ósea en el hueso craneofacial. Se utilizaron 56 ratas Wistar adultas de 0.40 a 0.60 kg con 5 a 6 meses de edad. Los animales fueron anestesiados con una combinación de etorfina-acepromacina 10%, 1,25 ml por kilogramo y atropina 7,4% administrada vía subcutánea. Los materiales examinados fueron membrana de politetrafluoroetileno, membrana de colágeno o un implante de astillas de hueso. El periostio y los músculos se suturaron en su lugar con catgut 4-0 (Ethicon) y el cuero cabelludo se suturó con seda 4-0 (Ethicon). La inversión de la anestesia se logró mediante Diprenorfin 10% a una dosis de 1,5 ml por kilogramo. Los animales fueron reintegrados en sus jaulas individuales y se observaron hasta la recuperación completa. Clínicamente durante todo el período de observación postoperatoria. El defecto óseo desarrollado cumplió con los requisitos de tamaño crítico. Debido a la remodelación del hueso recién formado y el hueso viejo, no fue difícil distinguir el original de los nuevos márgenes de los defectos óseos mediante microscopía óptica 6 y 12 meses después de la cirugía (Bosch, Melsen, & Vargervik, 1998).

Cooper y col, realizaron un estudio para probar el concepto del tamaño crítico en varios modelos diferentes. Utilizaron dos diferentes especies de roedores (incluyendo 28 ratones adultos y 6 ratas adultas) para evaluar la cicatrización ósea mediante análisis radiográfico 2D después de crear defectos óseos pequeños utilizando diferentes técnicas quirúrgicas (trepanación o ascensor). Desarrollaron defectos bicorticales, unilaterales y medio-parietales de 1.8mm en ratones con 10 semanas de edad, los cuales fueron sacrificados 1 año después y también desarrollaron defectos de 2.3 mm, en este caso los animales fueron sacrificados 6 semanas después. En ratas se realizó una cirugía de trepanación estándar de 8 mm de diámetro. Bicortical,

de espesor total, los defectos fueron creados usando un trépano de 8 mm de diámetro exterior en los huesos parietales de ratas Sprague Dawley (SD) y se dejó que las ratas curaran durante 6 semanas. Seis semanas después de la cirugía, las ratas se sacrificaron y la regeneración del defecto se evaluó mediante análisis radiográfico. Obtuvieron como resultados en los defectos de 1.8mm de diámetro una curación de un 50 por ciento 1 año después de la operación y en los defectos de 2.3 mm de diámetro mostraron aproximadamente 35 por ciento de curación después de 6 semanas (Cooper et al., 2010).

Spicer y col, desarrollaron en un modelo animal un defecto de la bóveda craneal en rata, el cual permitía la evaluación de biomateriales. Crearon un defecto en calota de ratas Fisher, usando un trépano dental realizaron una incisión de la línea media y la difusión de la piel, la fascia y capas suprayacentes periostio y la sutura sagital de la bóveda craneal. El hueso no fue penetrado por la fresa para evitar daños a los tejidos duros y cerebrales subyacentes como la duramadre ya que pueden jugar un papel en la cicatrización y regeneración ósea. El hueso se adelgazó considerablemente y se retiró utilizando instrumentos contundentes para separar el hueso de la duramadre subyacente. Una vez que se extirpó el hueso, el biomaterial de regeneración fue implantado y la herida se cerró mediante sutura de las capas del periostio y la piel. Los controles experimentales incluyeron un defecto vacío y el uso de autoinjerto, como controles negativos y positivos, respectivamente. El modelo que utilizaron representó un defecto rápido, reproducible y de tamaño crítico en la bóveda craneal de la rata. El cual permite la evaluación consistente de la regeneración ósea *in vivo* en un medio ambiente rentable y rápido (Spicer et al., 2012).

Dennis y col, desarrollaron geles a base de matriz extracelular ósea desmineralizada (MOD), matriz extracelular de tejido cartilaginoso (MC), hidroxapatita (HAp) y ácido hialurónico (AH) realizando una caracterización física y evaluación *in vitro* con células mesenquimales de cordón umbilical. Obtuvieron como resultados que los materiales no produjeron citotoxicidad y que pueden presentar un potencial terapéutico en una

gran variedad de defectos óseos (Dennis, Whitlow, Detamore, Kieweg, & Berkland, 2017).

Townsend y col, realizaron defectos críticos de 7.5mm en calvaria de rata, utilizando geles compuestos por ácido hialurónico (AH), hidroxiapatita (HAp), matriz extracelular ósea desmineralizada (MOD) y matriz extracelular de tejido cartilaginoso (MC) con o sin la adición de factores de crecimiento (BMP-2 y VEGF), obtuvieron como resultados que el cartílago descelularizado tiene potencial osteogénico para aplicaciones de regeneración ósea, aun sin la adición de factores de crecimiento (Townsend et al., 2017).

Muñoz y col, realizaron un estudio en el cual evaluaron histológicamente el efecto de dos biomateriales: derivado de matriz de submucosa de vejiga urinaria porcina (UBM) y b-fosfato tricálcico (b-TCP) en defectos óseos. Utilizaron veinte conejos macho raza Nueva Zelanda a los cuales le realizaron defectos de 5mm en el fémur de cada uno de los modelos y posteriormente colocaron el biomaterial. Sacrificaron los modelos a las 4 y 8 semanas. Obtuvieron como resultados que tanto el biomaterial de UBM como el b-TCP poseen la capacidad de promover la neoformación ósea, sin embargo, el biomaterial basado en UBM produjo un tejido mejor organizado con una menor respuesta inflamatoria en comparación con el grupo de b-TCP (Abraham Muñoz-Ruiz, 2017).

## 6 JUSTIFICACIÓN

En la práctica endodóntica es común encontrar lesiones que no solo afectan el tejido pulpar, sino también el tejido óseo, por eso es de suma importancia contar con biomateriales capaces de restaurar la pérdida ósea para recuperar su estructura y función. La necesidad de evitar la pérdida de tejido óseo, estimula la investigación y comparación del funcionamiento de biomateriales de distintos orígenes para lograr la regeneración del tejido óseo.

Para evaluar la eficacia y seguridad de cualquier biomaterial es necesario probarlo en modelos experimentales antes de iniciar estudios clínicos. Se requiere tener modelos estandarizados para evaluar nuevos biomateriales que puedan ser utilizados para regeneración ósea.

La calvaria es la porción fronto-parietal del cráneo con una capacidad limitada de reparación, esta condición la hace ideal para su estudio. El tamaño de los defectos de la bóveda craneal es un área de investigación activa, los modelos animales pequeños presentan ciertas limitaciones en la creación de defectos craneales, pero son una buena opción por su fácil manejo. Los injertos óseos desarrollados actualmente buscan imitar la conformación altamente porosa de la matriz extracelular. Por lo que proponemos utilizar la matriz extracelular de vejiga porcina en hidrogel ya que ha demostrado capacidades biológicas superiores y evaluar su potencial regenerativo en tejido óseo.

## **7 OBJETIVOS**

### **7.1 OBJETIVO GENERAL**

*Evaluar in vivo* un gel de matriz de vejiga porcina para regeneración ósea en calota de rata.

### **7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Desarrollar un defecto crítico en calvaria de rata.
- 2.- Evaluar radiográfica e histológicamente la regeneración ósea *in vivo* del hidrogel.
- 3.- Comparar el grado de regeneración ósea en los diferentes grupos de estudio.

## 8 MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Lugar de Obtención de las muestras

Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

### 8.2 Tipo de estudio

Experimental *in vivo*, Comparativo, Longitudinal, Prospectivo.

### 8.3 Modelo de estudio

Un total de 16 ratas hembras adultas de cepa Wistar (Fig 1) (3 por grupo a excepción de los grupos controles donde fueron 1 modelo experimental por periodo de tiempo), de cuatro meses de edad y con un peso aproximado entre 250 y 350 gramos, fueron utilizadas para el experimento. Los animales se mantuvieron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo condiciones controladas de temperatura ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ ) y humedad ( $50\% \pm 10$ ), con acceso *ad libitum* de agua y alimento (LabDiet, Pet Food).



**Figura 1 Rata Wistar**

## **8.4 Muestra**

### **8.4.1 Tamaño de muestra**

Se utilizaron 4 grupos con 3 animales de experimentación, cada uno a 2 periodos de tiempo. Los grupos control constaron de un modelo experimental por tiempo, con un total de 16 modelos experimentales.

Grupo 1: Colocación de matriz extracelular en gel.

Grupo 2: Colocación de matriz extracelular en gel con hidroxiapatita.

Grupo 3: Control positivo (autoinjerto).

Grupo 4: Control negativo (sin tratamiento).

### **8.4.2 Criterios de inclusión**

- Ratas Wistar hembras sanas.
- 4 meses de edad.
- Peso aproximado de 250 a 350 gramos.

### **8.4.3 Criterios de Eliminación**

- Ratas a las que no se les pudo realizar el defecto óseo en calota.
- Ratas que sufrieron infección después de la intervención.

## **8.5 Metodología**

### **8.5.1 Obtención de los materiales a evaluar**

El Autoinjerto se obtuvo de otro animal de experimentación ya que las ratas son genéticamente iguales (Singénicos).

### **8.5.2 Obtención de la matriz extracelular descelularizada**

Las vejigas porcinas fueron donadas por un rastro certificado (fig.2) (Fapsa y Asociados S.A. de C.V), se procedió a su descontaminación enjuagando por 5 minutos en una solución compuesta por 900 ml de agua desionizada y 100 ml de isodine. Después se colocó en una solución transportadora 500 ml de PBS con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0.625 µg/ml de anfotericina, para finalmente ser llevada al laboratorio para su delaminación y descelularización.

Se descelularizaron siguiendo el protocolo previamente establecido por Silva Benítez y col, una vez en el laboratorio se cortó la vejiga por la mitad, dejando expuesta la parte interna. La delaminación mecánica se llevó a cabo separando la MEC, cortándola por la parte media para de esta manera exponer el epitelio interno y separar la lámina basal del músculo.

Una vez delaminada, la MEC se cortó en andamios de aproximadamente 3 x 3 centímetros para después ser colocada en agua destilada bajo agitación constante por 48 horas a 4 °C.

Posteriormente se colocó por una hora en tripsina al 0.03% en un volumen 1:15 basándonos en el peso de la MEC a 37°C a 200 rpm.

El tratamiento realizado con la tripsina se inactivó colocando los bioandamios en una solución de PBS 1X con suero bovino fetal al 10% durante la noche a 4°C bajo agitación constante.

Después la matriz fue colocada en Tritón X100 al 0.5% e hidróxido de amonio al 0.05% por tres días a 4°C bajo agitación constante realizando cambios de la solución cada 24 horas.

Las muestras de MEC finalmente se colocaron en agua destilada por 48 horas a 4 °C bajo agitación constante para eliminar la presencia del Tritón X100.

Luego las matrices fueron congeladas por dos días a -80°C para ser liofilizadas con un vacío aproximado de  $339 \times 10^{-3}$ mbar y una temperatura de -48°C durante dos días.

Las MEC obtenidas fueron esterilizadas colocándose bajo luz ultravioleta durante 20 minutos (Silva-Benitez et al., 2015).



**Figura 2 Vejigas porcinas**

### **8.5.3 Caracterización del gel**

Se obtuvo un polvo fino de MEC, se pesó 1 g de MEC liofilizada en polvo y 100 mg de pepsina (Sigma 2500 U/mg) fueron mezclados en 100 ml de 0.01 M HCl por 49 h a temperatura ambiente (25°C). El resultado fue una solución viscosa llamada pre-gel, el cual tuvo un pH aproximado de 3.0 a 4.0. La actividad de la pepsina fue inactivada cuando el pH se llevó a 7.4 (Soto-Sainz, 2016).

Los geles de MEC fueron conformados mezclando 0.1 NaOH (1/10 de el volumen de la solución del pre-gel) y PBS 10x con un pH 7.4 (1/9 del volumen de la solución del pre-gel) a 4°C. Finalmente se realizaron alícuotas de 1 mL y fueron congeladas a -20°C y descongeladas hasta el día de su uso, una vez descongeladas las alícuotas se les adicionó hidroxiapatita (HAp) (Sigma Aldrich) (50mg/mL), una vez biofuncionalizados fueron homogenizados por 30 seg y colocados en los pocillos, por último para que la gelatinización ocurriera fue colocado a una temperatura de 37°C por 30 min (Soto-Sainz, 2016).

### **8.5.4 Procedimiento**

#### **8.5.4.1 Preparación preoperatoria**

Se esterilizaron todos los instrumentos quirúrgicos en autoclave y se les dio tiempo para que se enfriaran a temperatura ambiente (20-25 °C). La mesa de trabajo fue desinfectada con etanol al 70%(fig.3) (Spicer et al., 2012).



**Figura 3. Mesa de trabajo e instrumental.**

Los animales fueron pesados para colocar la anestesia utilizando inyección intramuscular (fig. 4) de 70 mg/kg de ketamina (Anesket, Pisa) y 25 mg/Kg de xilacina (Procin, Pisa). Se evaluó la profundidad de la anestesia por la falta de reflejo al pellizcar la pata. Después de comprobar la profundidad de la anestesia, se tomó una radiografía preoperatoria (fig.5) y después el animal fue afeitado desde el puente del hocico entre los ojos para el extremo caudal del cráneo / bóveda craneal, después del afeitado, un hisopo con alcohol fue utilizado para eliminar los recortes de pelo y se aplicó lacrilube a cada ojo (Spicer et al., 2012).



**Figura 4. Técnica de inyección intramuscular.**

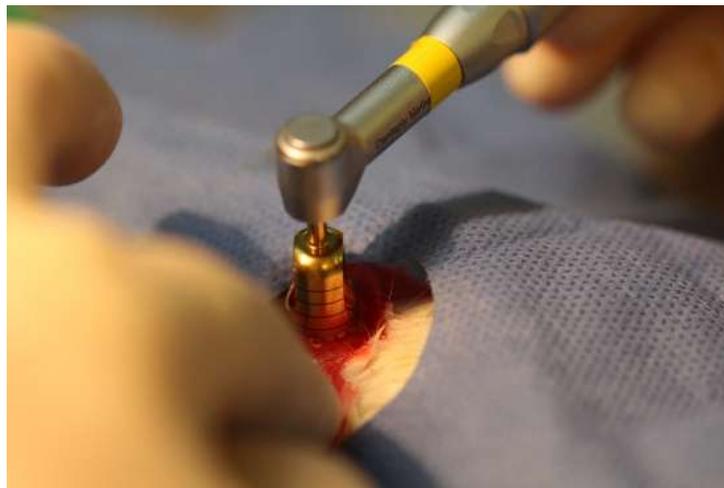


**Figura 5. Toma de radiografía con Radiovisiógrafo RVG 5010 Kodak.**

Se desinfectó el campo de afeitado y las zonas circundantes con hisopos con yodo, teniendo cuidado de no aplicar la solución sobre los ojos. Se colocó un paño estéril sobre el cuerpo, y se inyectó 0,5 ml de lidocaína al 1% con epinefrina 1: 100.000 por vía subcutánea a lo largo de la línea media sagital del cráneo (Spicer et al., 2012).

#### 8.5.4.2 Procedimiento Operatorio

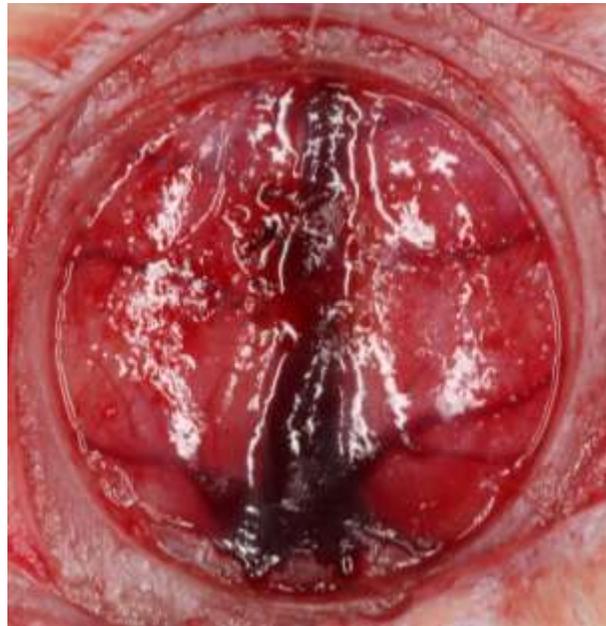
Utilizando el bisturí, se realizó una incisión de aproximadamente 1.5 cm hasta el periostio sobre el cuero cabelludo del hueso nasal a la parte caudal para visualizar la bóveda craneal, se separó el periostio que cubre la bóveda craneal por la línea media sagital con el bisturí, el cual se empujó suavemente hacia los lados usando un elevador de periostio. Se insertó un retractor para separar los tejidos blandos y exponer el hueso subyacente, el cual se irrigó con solución salina normal estéril. El defecto fue realizado con una fresa trepanadora de 8 mm de diámetro (fig 6) (Hufriedy) a 1500 rpm, irrigando la fresa y la bóveda craneal con gota a gota de solución salina estéril en aproximadamente 1 gota cada 2 segundos. La velocidad lenta de la fresa y la irrigación son fundamentales para prevenir la lesión térmica, que pueda dañar el tejido en los márgenes del defecto y producir confusión en los resultados (Spicer et al., 2012).



**Figura 6. Creando el defecto con fresa trepanadora.**

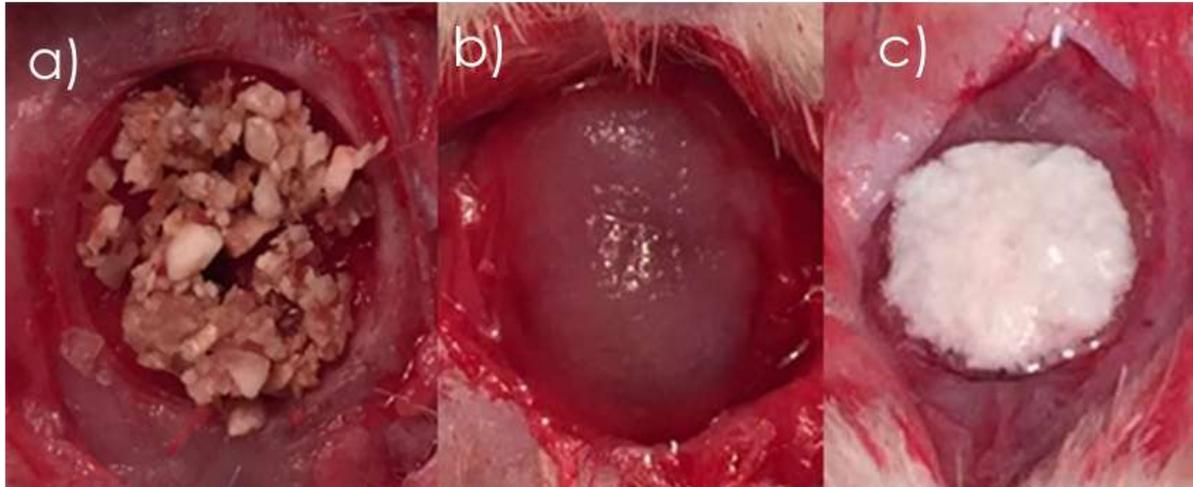
Continuando con la trepanación, se aplicó presión más suave mientras se trepanó alrededor de los márgenes del defecto, se colocó el elevador de periostio (P20, Hufriedy) en el margen de defecto moviéndose circunferencialmente alrededor del defecto aplicando una presión suave para completar el defecto levantando suavemente con el elevador de periostio realizando un movimiento hacia atrás y

adelante liberando la duramadre desde el lado inferior del hueso. Una vez que la duramadre se liberó, se usó el elevador como un brazo de palanca para separar la bóveda craneal de la duramadre, terminando el defecto (fig. 7). La periferia del defecto fue evaluada por cualquier fragmento de huesos presente, los fragmentos se eliminan cuidadosamente mediante el uso del elevador (Spicer et al., 2012).



**Figura 7. Defecto óseo.**

El defecto fue lavado abundantemente con solución salina estéril para eliminar todos los fragmentos de hueso y se colocó el material de implante en el defecto (fig.8); se cerró el periostio sobre el implante utilizando una sutura continua 4-0 monocryl, y la piel sobre el periostio utilizando puntos con sutura 3-0 de catgut (Spicer et al., 2012). Se tomó una radiografía posoperatoria del defecto creado.



**Figura 8. Colocación implante.**

a) Autoinjerto, b) Gel de MEC y c) Gel de MEC + HAp

#### 8.5.4.3 Cuidado posoperatorio

Una vez terminada la cirugía, se limpió cuidadosamente la cabeza con solución salina para eliminar la sangre. Cuando finalizó la observación, se transfirieron las ratas a las jaulas por separado hasta su sacrificio. (Spicer et al., 2012).

#### 8.5.4.4 Sacrificio y toma de muestra

Cumplidos los periodos de evaluación (12 y 16 semanas), se realizó la eutanasia de los modelos experimentales en una cámara de cloroformo. Se tomó una radiografía y la calota fue almacenada en polyfreeze para su evaluación histológica con su respectiva identificación (Spicer et al., 2012).

### **8.5.5 Análisis Radiográfico**

Todas las radiografías fueron tomadas con ayuda del radiovisiógrafo RVG 5010 (Kodak), con el fin de evaluar la evidencia de crecimiento óseo en el defecto quirúrgico (Spicer et al., 2012).

### **8.5.6 Análisis Histológico**

Se realizaron cortes seriados de 10 µm de espesor con la ayuda de un crióstato (Leica CM-1520), los cuales fueron teñidas con hematoxilina eosina, rojo de alizarina y tricrómica de Masson para evaluar la composición del tejido neoformado, con ayuda de un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Leica).

#### **8.5.6.1 Tinción de Hematoxilina eosina**

Se colocaron los portaobjetos con las muestras 1 minuto en hematoxilina. Se lavó con agua destilada. Se colocaron en bicarbonato de sodio al 0.01% por 1 minuto. Se pasaron a etanol ácido durante 20 segundos, posteriormente en etanol al 70% por 30 segundos, en etanol al 100% por 15 segundos. Se colocaron en xileno durante 1 minuto. Se dejaron secar y se montaron en resina (Entellan) una gotita en la preparación.

#### **8.5.6.2 Tinción Tricrómica de Masson**

El equipo de tinción para histología contiene:

Líquido de Bouin 1 x 125 ml

Fucsina ácida-escarlata de Biebrich 1 x 125ml

Ácido fosfomolibdico - fosfotúngstico 1 x 125ml

Azul de Anilina 1 x 125ml

Hematoxilina de Weigert 1 x 125ml

Cloruro Férrico 0,8% 1x 125ml

Procedimiento:

Se fijó en la solución de Bouin durante 1 hora a 56°C para mejorar la calidad de la tinción, se enjuago con agua corriente durante 5-10 minutos para eliminar el color amarillo, se colocó en solución de trabajo de hematoxilina de Weigert hierro durante 10 minutos y se enjuago con agua corriente durante 10 minutos, se lavó con agua destilada, posteriormente se colocó en solución de Fuchina escarlata de Biebrich durante 15 minutos, se lavó con agua destilada y se colocó en solución de ácido fosfomolibdico – fosfotúngstico durante 15 minutos, se transfirieron las muestras directamente a la solución de azul de anilina durante 10 minutos, se enjuago en agua destilada, se colocó en solución de ácido acético al 1% durante 5 minutos, se lavó con agua destilada, se deshidrataron con etanol al 95%, etanol absoluto y xileno.y se les colocó resina (Entellan) una gotita en la preparación.

## **8.6 Lugar de realización**

Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

## **8.7 Financiamiento**

Beca CONACYT

No. CVU: 710472

No. Registro Becario: 582334

## 9 RESULTADOS

### 9.1.1 Evaluación Macroscópica

En el grupo control negativo se observó una membrana de tejido muy delgada trasluciéndose la arteria media cerebral (figura.9, a). En el grupo control positivo al cual se le colocó autoinjerto se observó el granulado del autoinjerto, por lo cual la cicatrización es sumamente cruenta (figura.9, b). En el grupo al cual se le colocó el gel de matriz extracelular se observó adaptación de los tejidos (figura. 9, c). En el grupo de gel de matriz extracelular biofuncionalizado con hidroxapatita se observó una adaptación de los tejidos (figura. 9, d).



**Figura 9 Fotografías al momento de realizar el sacrificio del modelo experimental de cada grupo:**

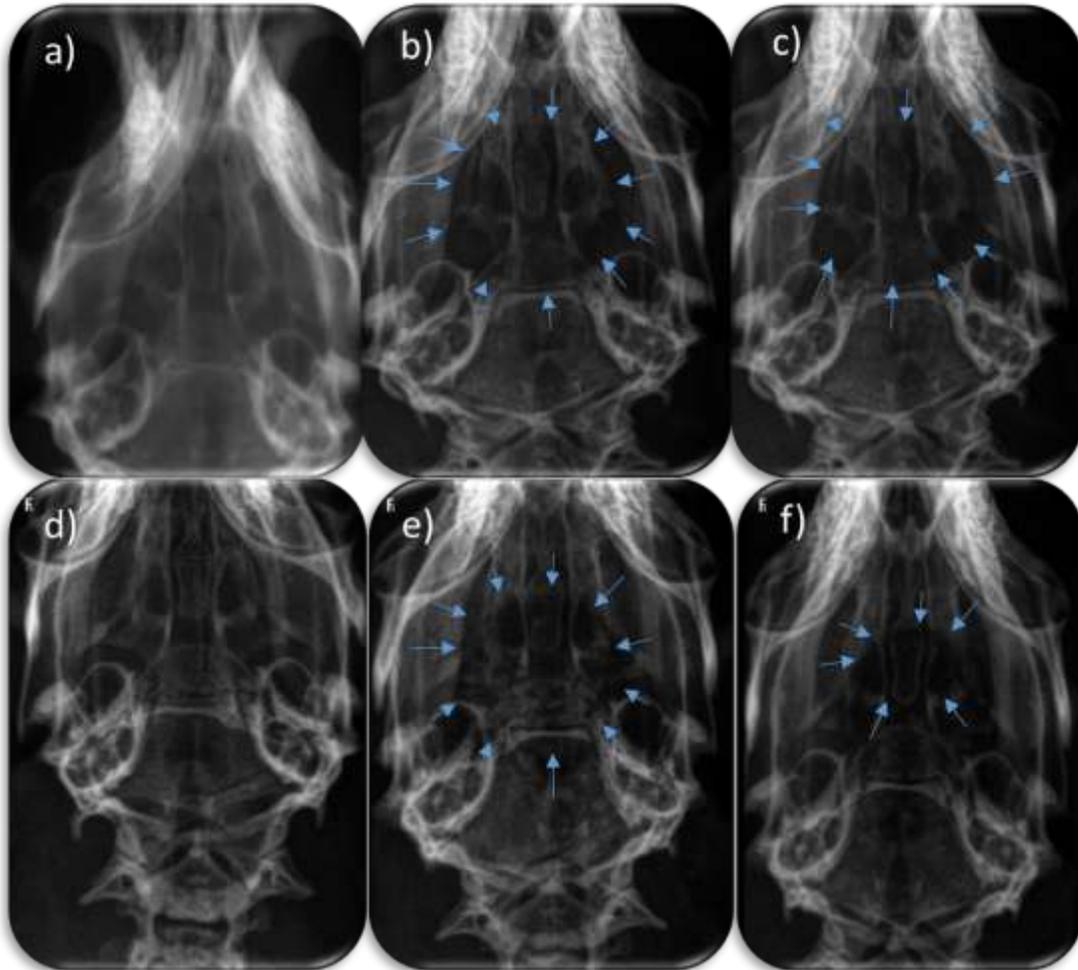
a) Control negativo, b) Control positivo, c) Gel de MEC, d) Gel de MEC con HAp.

### 9.1.2 Evaluación Radiográfica

Se tomaron tres radiografías a cada rata (preoperatoria, postoperatoria y de sacrificio).

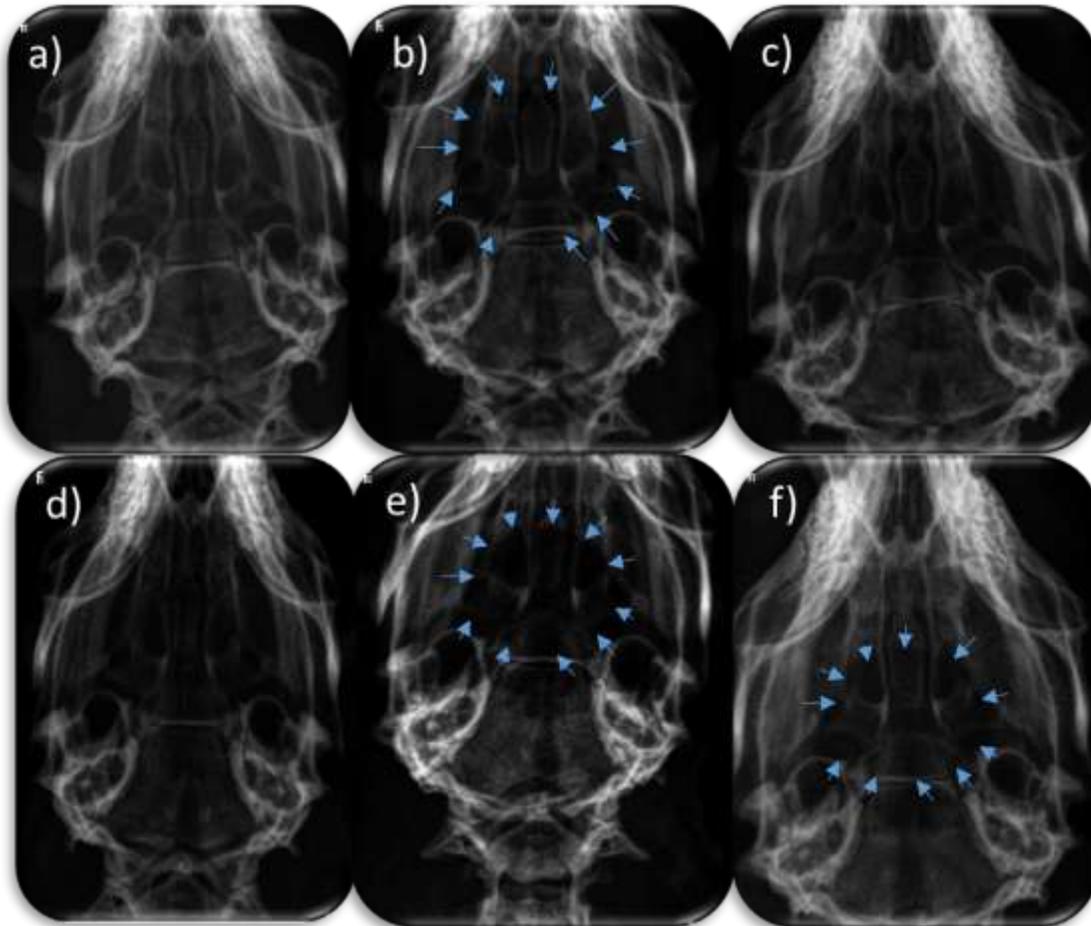
En el grupo control negativo se observó en la radiografía post operatoria una zona radiolúcida (figura. 10, b) que indica el defecto óseo que se le realizó a la rata y en la radiografía de sacrificio (figura. 10, c) la zona radiolúcida sigue apareciendo. En el

grupo control positivo se observó en la radiografía de sacrificio (figura. 10, f) que la zona radiolúcida sigue apareciendo pero solo como una media luna



**Figura 10. Radiografías representativas del Grupo Control Negativo y Control Positivo.** a) Rx Preoperatoria control negativo, b) Rx postoperatoria control negativo, c) Rx de Sacrificio control negativo, d) Rx preoperatoria control positivo, e) Rx postoperatoria control positivo y f) Rx de sacrificio control positivo.

En el grupo de gel de MEC se observó como en la radiografía de sacrificio la zona radiolúcida ya no aparece (Fig. 11, c) y en el grupo de gel de MEC con HAp se observa que la zona radiolúcida sigue apareciendo en la radiografía de sacrificio (Fig. 11, f).



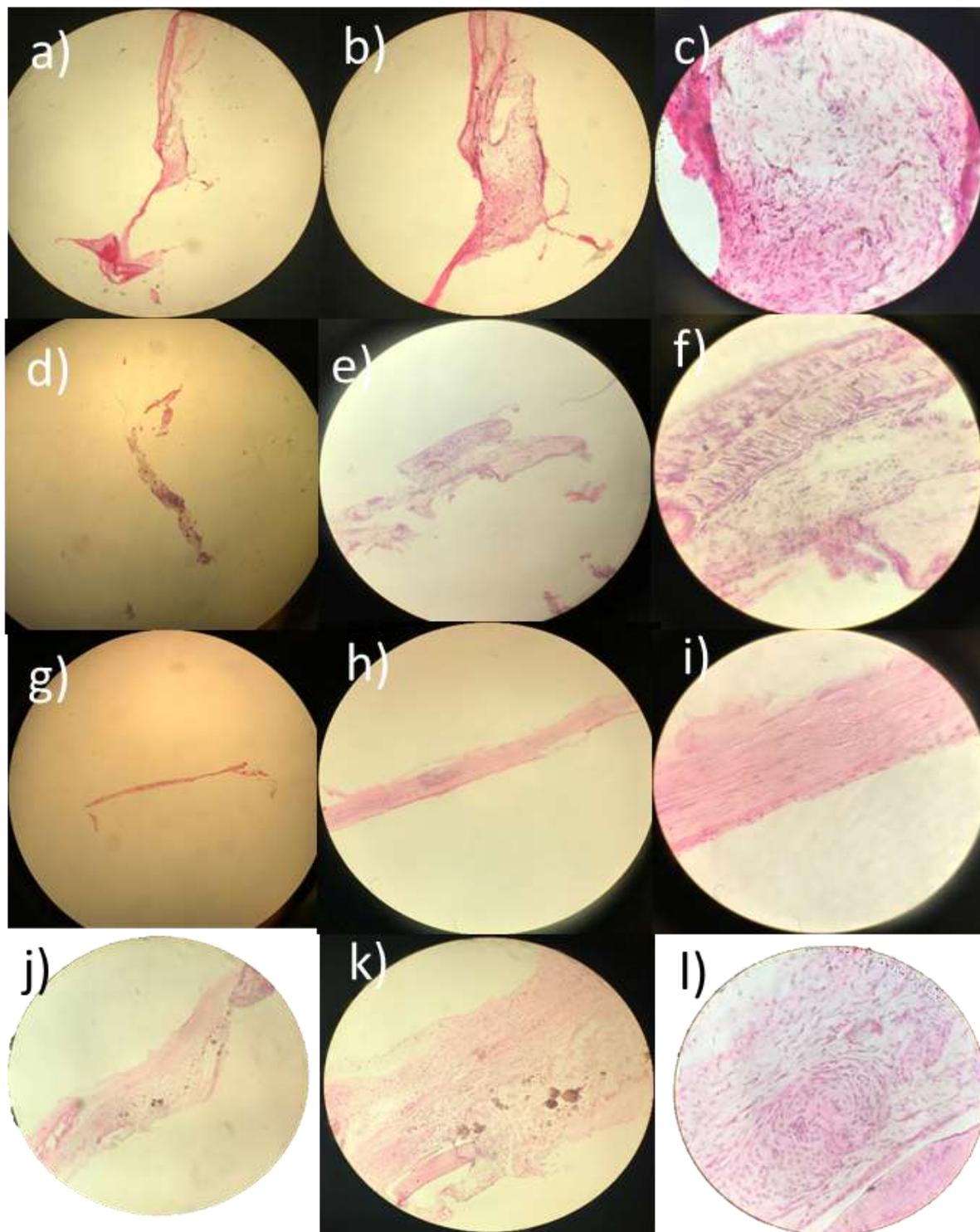
**Figura 11 Radiografías representativas del Grupo Gel de MEC y Gel de MEC con HAp.** a) Rx Preoperatoria gel de MEC, b) Rx postoperatoria gel de MEC, c) Rx de Sacrificio gel de MEC, d) Rx preoperatoria gel de MEC con HAp, e) Rx postoperatoria gel de MEC con HAp y f) Rx de sacrificio gel de MEC con HAp.

### 9.1.3 Evaluación Histológica

Se realizaron tres tinciones (H&E, Rojo de Alizarina y Tricrómica de Masson) a dos diferentes tiempos (12 semanas y 16 semanas).

A las 12 semanas con la tinción de H&E de menor a mayor aumento (4x, 10x y 40x) observamos en los distintos grupos: control negativo (Fig. 12 a,b y c); control positivo

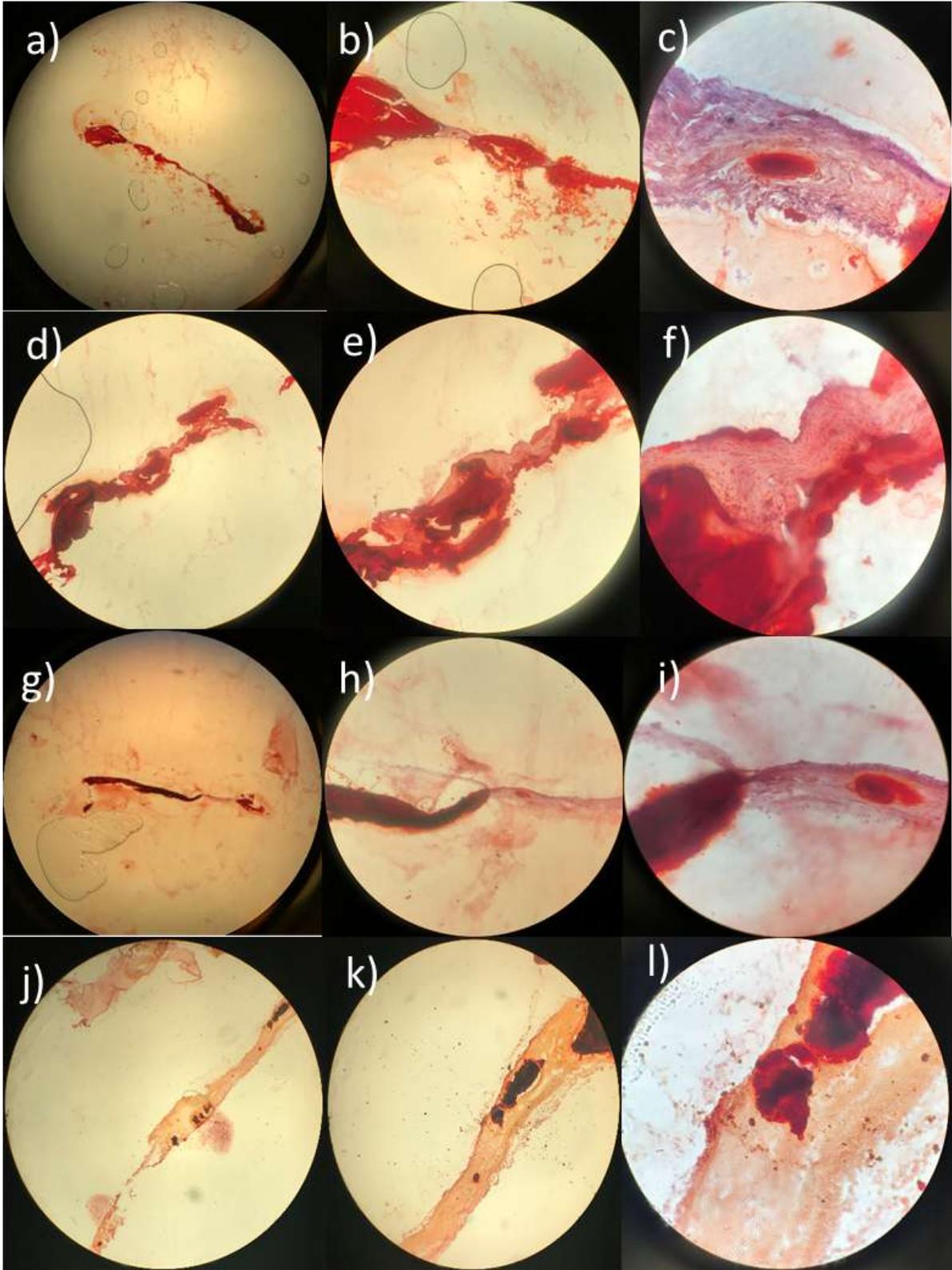
(Fig. 12 d, e y f); gel de MEC (Fig. 12 g, h e i ); gel de MEC con Hap (Fig. 12 j, k y l). En el grupo control negativo abundante tejido conectivo, un fragmento de tejido óseo y gran cantidad de células compatibles con fibroblastos con fibras de colágena. En el grupo control positivo se observó fragmento de tejido óseo con abundantes fibras de colágena alrededor, observándose fragmentos de hueso correspondientes al autoinjerto y entre ellos tejido conectivo entrelazándolos. En el grupo de gel de MEC se observó con aumento 10x una zona calcificada, que a mayor aumento 40x mostró osteocitos y algunas lagunas óseas rodeadas de tejido conectivo con abundantes fibroblastos. En el grupo de gel de MEC con HAp se observan algunas zonas calcificadas y unas zonas que birrefringen lo que puede ser el material de HAp; a un mayor aumento podemos observar una zona de células inflamatorias donde se está formando un granuloma (figura. 12).



**Figura 12. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 12 semanas con tinción H&E.** a) Control negativo: Vista panorámica del fragmento de tejido (4x), b) Control negativo: 10x fragmento con abundante tejido conectivo, c) Control negativo: gran número de células compatibles con fibroblastos con fibras de

colágena, d) Control positivo: a 4x identificación de tejidos como el tejido conectivo y fragmentos de tejido óseo, e) Control positivo: a 10x parte del tejido fibroso abundantemente colagenizado con fragmentos de tejido óseo, f) Control positivo: a 40x abundantes fibroblastos rodeando el tejido óseo, g) gel de MEC: a 4x fragmento completo de la muestra, h) gel de MEC: a 10x tejido conjuntivo, i) gel de MEC: a 40x diferenciación del tejido fibroso con el área de tejido óseo con lagunas óseas con osteocitos en su interior, también se observan líneas lamelares de desarrollo, j) gel de MEC con HAp: a 4x, k) gel de MEC con HAp: a 10x zonas calcificadas y zonas que birrefringen lo que puede ser material de HAp, l) gel de MEC con HAp: a 40x zona de células inflamatorias donde se está formando un granuloma.

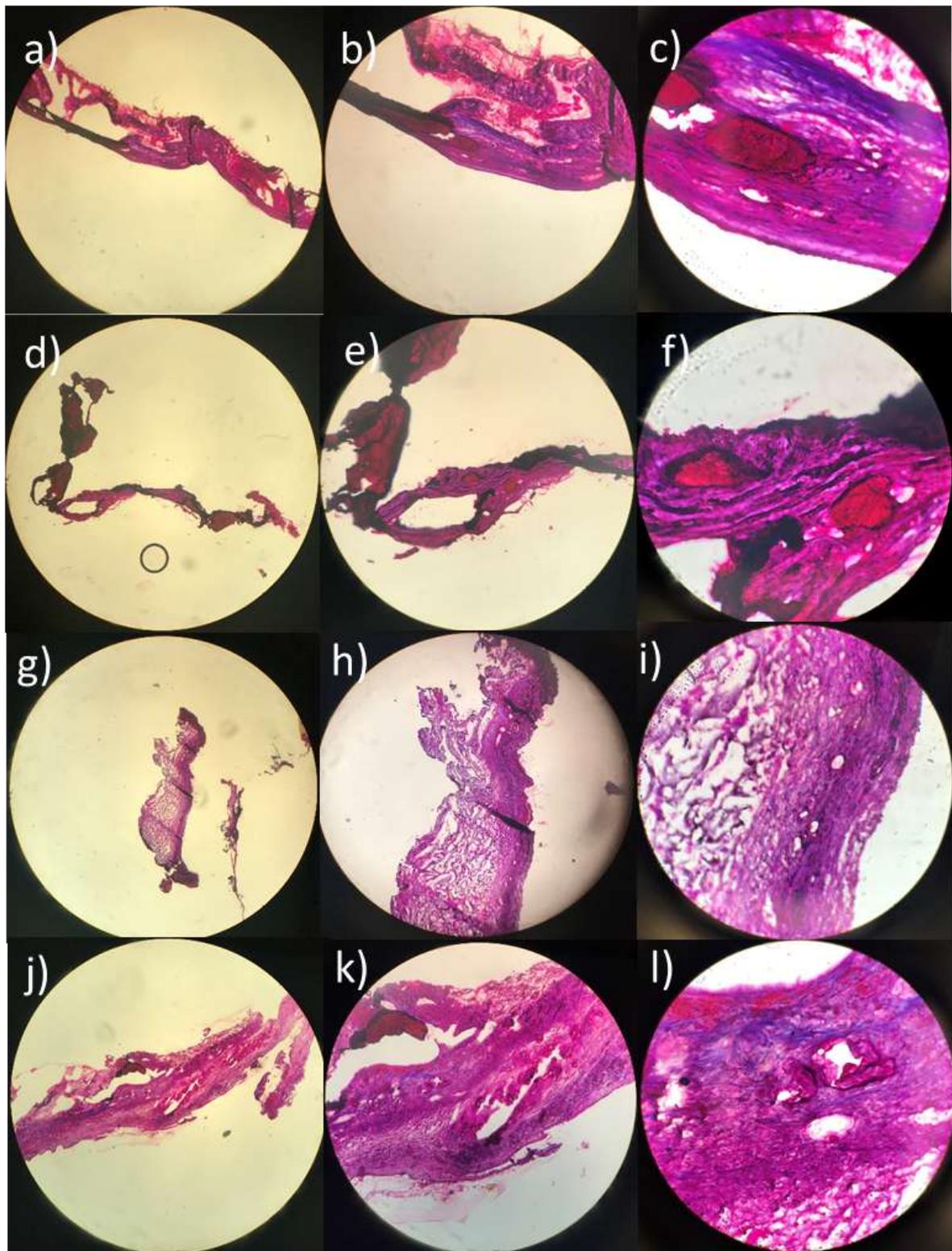
A las 12 semanas con la tinción Rojo de Alizarina de menor a mayor aumento (4x, 10x y 40x) observamos en los distintos grupos: control negativo (Fig. 13, a,b y c); control positivo (Fig. 13, d, e y f); gel de MEC (Fig. 13, g, h e i ); gel de MEC con Hap (Fig. 13, j, k y l). En el grupo control negativo podemos presenciar a 4x el fragmento en su totalidad, a mayor aumento examinamos la calcificación en el centro del tejido conectivo y a un mayor aumento contemplamos la presencia de un pequeño fragmento de tejido osificante compatible con calcosferitos y abundantes fibras de colágeno a su alrededor. En el grupo control negativo se observan fragmentos de calcificación y a un mayor aumento podemos contemplar las fibras de colágena muy bien definidas y los fibroblastos. En el grupo de gel de MEC distinguimos una calcificación en el centro de la muestra y a un mayor aumento podemos observar esa zona de calcificación bien definida rodeada de fibroblastos y tejido conectivo. En el grupo gel de MEC con HAp podemos percibir que hay fragmentos compatibles con depósitos de calcio (figura. 13).



**Figura 13. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 12 semanas con tinción Rojo de Alizarina. a) Control negativo: a 4x fragmentos de**

calcificaciones o depósitos de calcio, b) Control negativo: a 10x fragmento de tejido conectivo, c) Control negativo: a 40x tejido conectivo con una zona de calcificación en su interior, d) Control positivo: a 4x fragmento en su totalidad, e) Control positivo: a 10x, f) Control positivo: a 40x tejido conjuntivo altamente colagenizado acompañando a los fragmentos del autoinjerto, g) gel de MEC: a 4x, h) gel de MEC: a 10x, i) gel de MEC: a 40x tejido fibroso con zona de calcificación, j) gel de MEC con HAp: a 4x, k) gel de MEC con HAp: a 10x, l) gel de MEC con HAp: a 40x fragmentos compatibles con HAp.

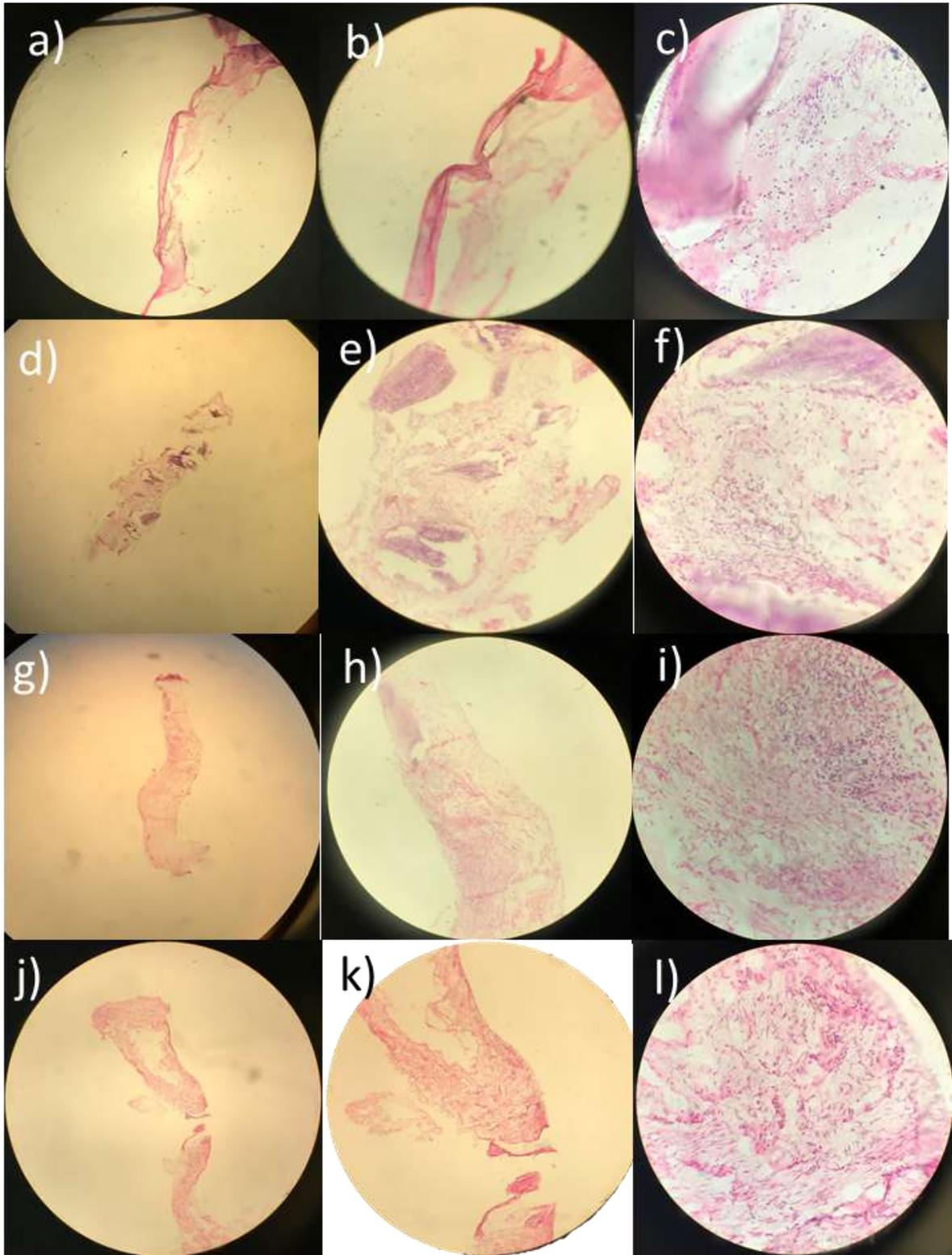
A las 12 semanas con la tinción Tricrómica de Masson de menor a mayor aumento (4x, 10x y 40x) observamos en los distintos grupos: control negativo (Fig. 14, a, b y c); control positivo (Fig. 14, d, e y f); gel de MEC (Fig. 14, g, h, e i); gel de MEC con Hap (Fig. 14, j, k y l). En el grupo control negativo podemos distinguir un fragmento de tejido óseo, a un mayor aumento se percibe un fragmento de tejido óseo con fibras de colágena, a un mayor aumento (40x) se aprecian las fibras de colágena bien teñidas y el fragmento de tejido óseo. En el grupo de control positivo se contemplan fragmentos de tejido óseo que están adheridos al tejido conectivo. En el grupo de gel de MEC podemos examinar que hay múltiples vasos sanguíneos lo cual nos indica una neoformación vascular por cual nos dice que es un tejido vital existiendo angiogénesis de los tejidos. En el grupo de gel de MEC con HAp podemos percibir pequeños fragmentos compatibles con HAp rodeado con fibras de colágena y observamos que no se unen al tejido conectivo (figura.14).



**Figura 14. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 12 semanas con tinción Tricrómica de Masson. a) Control negativo: a 4x fragmento de tejido óseo, b) Control negativo: a 10x fragmento de tejido óseo con fibras de**

colágena, c) Control negativo: a 40x fibras de colágena y fragmento de tejido óseo, d) Control positivo: a 4x, e) Control positivo: a 10x, f) Control positivo: a 40x fragmentos de tejido óseo adheridos al tejido conectivo, g) Gel de MEC: a 4x, h) Gel de MEC: a 10x, i) Gel de MEC: a 40x múltiples vasos sanguíneos lo cual indica neoformación vascular, angiogénesis del tejido, j) Gel de MEC con HAp: a 4x, k) Gel de MEC con HAp: a 10x, l) Gel de MEC con HAp: a 40x pequeños fragmentos compatibles con HAp rodeado con fibras de colágena.

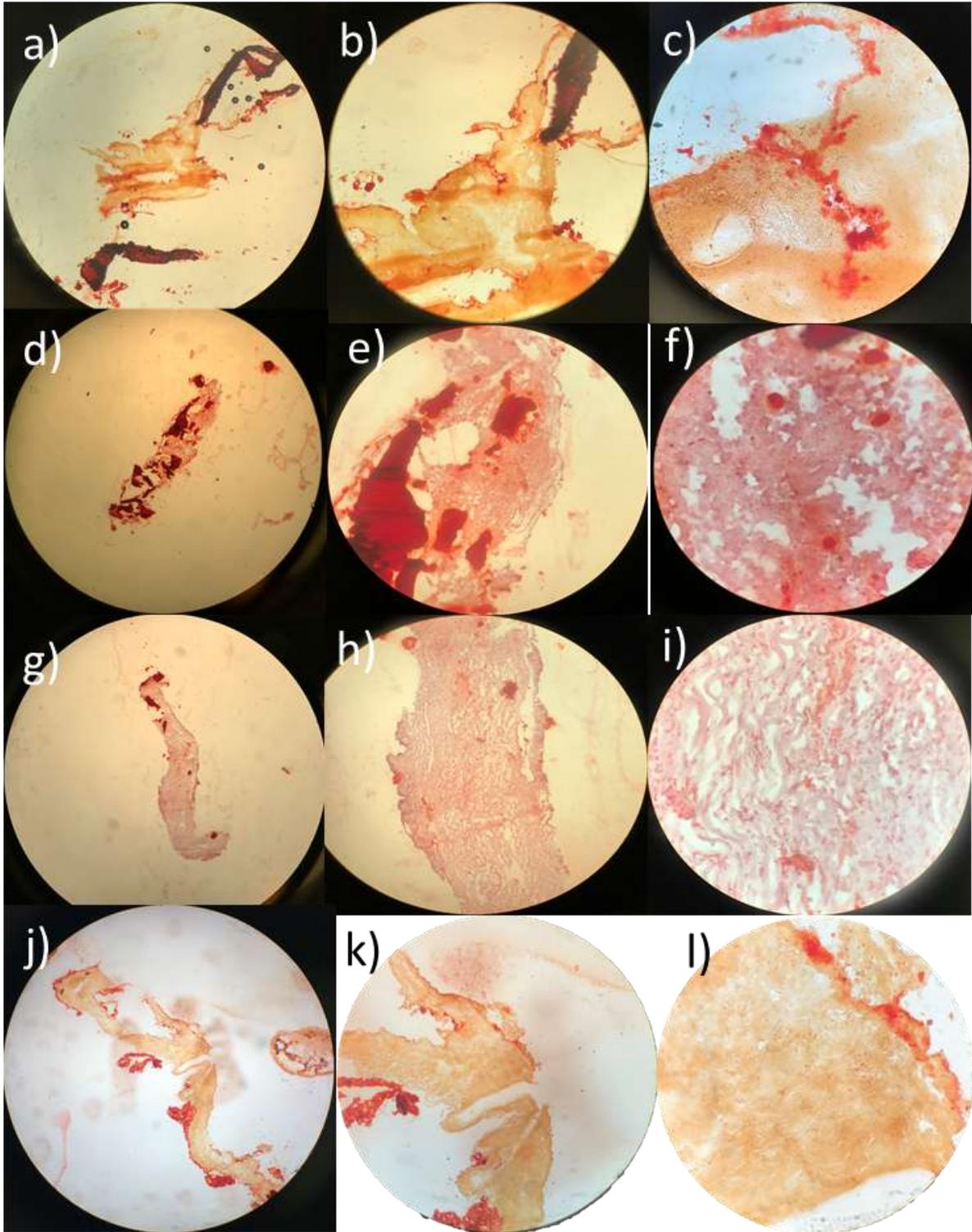
A las 16 semanas con la tinción H&E de menor a mayor aumento (4x, 10x y 40x) observamos en los distintos grupos: control negativo (Fig. 15, a,b y c); control positivo (Fig. 15, d, e y f); gel de MEC (Fig.15, g, h e i); gel de MEC con Hap (Fig. 15, j, k y l). En el grupo control negativo podemos distinguir a 4x un fragmento de tejido conectivo, a un mayor aumento 40x podemos apreciar abundantes células inflamatorias que corresponden a linfocitos y algunos fibroblastos. En el grupo control positivo podemos contemplar múltiples fragmentos óseos correspondientes al autoinjerto, a mayor aumento se observa que los fragmentos de tejido óseo se encuentran unidos al tejido conectivo, también podemos distinguir múltiples fibroblastos de un tejido conectivo laxo uniendo dos fragmentos de tejido óseo. En el grupo de gel de MEC contemplamos zonas más laxas que otras, presencia de fragmento de tejido óseo, a mayor aumento se perciben células inflamatorias y abundantes fibras de colágena y fibroblastos. En el grupo de gel de MEC con HAp se aprecian fragmentos de tejido conectivo a mayor aumento podemos notar células inflamatorias con fibroblastos (figura. 15).



**Figura 15. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 16 semanas con tinción H&E. a) Control negativo: a 4x fragmento de tejido conectivo,**

b) Control negativo: a 10x, c) Control negativo: a 40x abundantes células inflamatorias que corresponden a linfocitos y algunos fibroblastos, d) Control positivo: a 4x, e) Control positivo: a 10x, f) Control positivo: a 40x varios fragmentos con matriz osteoide acompañado de abundantes fibroblastos, g) Gel de MEC: a 4x, h) Gel de MEC: a 10x, i) Gel de MEC: a 40x zonas más laxas que otras y más colagenizadas que otras, fragmento de tejido óseo y una hiper celularidad en su mayoría fibroblastos, j) Gel de MEC con HAp: a 4x, k) Gel de MEC con HAp: a 10x, l) Gel de MEC con HAp: a 40x fragmentos de tejido conectivo, células inflamatorias con fibroblastos.

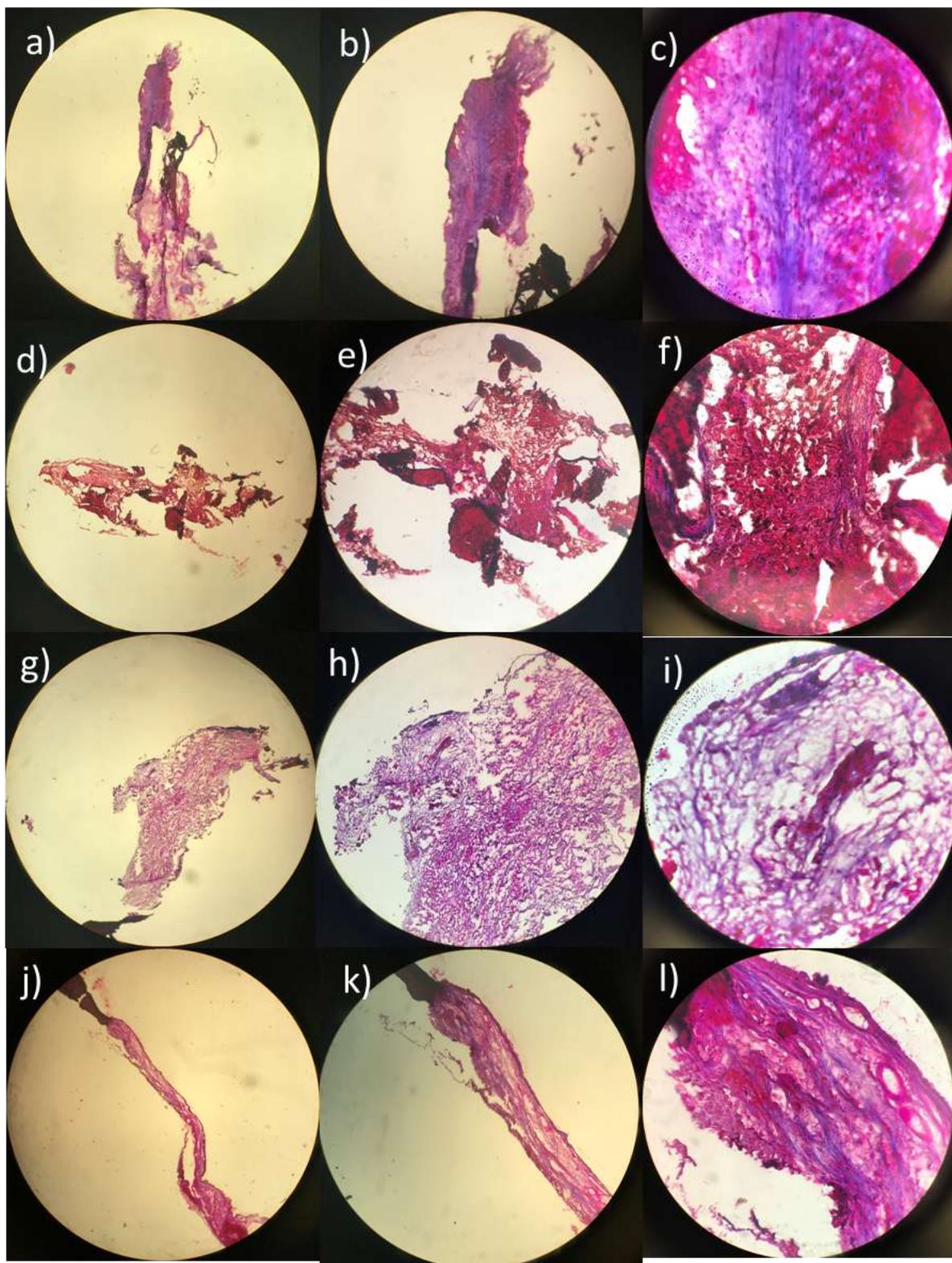
A las 16 semanas con la tinción Rojo de Alizarina de menor a mayor aumento (4x, 10x y 40x) observamos en los distintos grupos: control negativo (Fig. 16, a, b y c); control positivo (Fig. 16, d, e y f); gel de MEC (Fig. 16, g, h e i); gel de MEC con HAp (Fig.16, j, k y l). En el grupo control negativo se distinguen dos fragmentos de tejido óseo y una zona de tejido conectivo con áreas de ligeras calcificaciones. En el grupo de control positivo se aprecian calcificaciones y tejido conectivo alrededor de ellas. En el grupo gel de MEC se perciben depósitos de calcio y fibras de colágena que a 40x se contemplan que ya están a punto de calcificación transformándose a colágena tipo I. En el grupo de gel de MEC con HAp observamos que la HAp no se encuentra dentro del tejido conectivo, y no se percatan calcificaciones (figura. 16).



**Figura 16. Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 16 semanas con tinción Rojo de Alizarina. a) Control negativo: a 4x, b) Control negativo: a 10x, c) Control negativo: a 40x fragmento de tejido óseo y zona de tejido**

conectivo con áreas de ligeras calcificaciones, d) Control positivo: a 4x, e) Control positivo: a 10x, f) Control positivo: a 40x proliferación y pequeños fragmentos de cristales de calcio, g) Gel de MEC: a 4x, h) Gel de MEC: a 10x, i) Gel de MEC: a 40x depósitos de calcio con abundante colágena y fibroblastos, j) Gel de MEC con HAp: a 4x, k) Gel de MEC con HAp: a 10x, l) Gel de MEC con HAp: a 40x la HAp no se encuentra dentro del tejido conectivo y no se observan calcificaciones.

A las 16 semanas con la tinción Tricrómica de Masson de menor a mayor aumento (4x, 10x y 40x) distinguimos en los distintos grupos: control negativo (Fig.17, a, b y c); control positivo (Fig. 17, d, e y f); gel de MEC (Fig.17 g, h e i); gel de MEC con Hap (Fig. 17, j, k y l). En el grupo control negativo podemos notar múltiples fragmentos donde podemos contemplar fibras de colágena con abundantes fibroblastos. En el grupo de control positivo podemos observar múltiples fragmentos entrelazados y unidos por un estroma de tejido conjuntivo denso con muchas fibras de colágena. En el grupo gel de MEC se aprecian muchas fibras de colágena que a mayor aumento hay aparentes calcificaciones, a 40x nos percatamos de formación de tejido óseo con áreas inmaduras y maduras. En el grupo gel de MEC con HAp divisamos tejido conectivo donde se aprecia áreas de neoformación vascular, sin encontrar zonas de calcificaciones (figura. 17).



**Figura 17 Muestras histológicas de los diferentes grupos de estudios a 16 semanas con tinción Tricrómica de Masson. a) Control negativo: a 4x, b) Control**

negativo: a 10x, c) Control negativo: a 40x fibras de colágena con abundantes fibroblastos, d) Control positivo: a 4x, e) Control positivo: a 10x, f) Control positivo: a 40x múltiples fragmentos entrelazados y unidos por un estroma de tejido conjuntivo denso con muchas fibras de colágena, g) Gel de MEC: a 4x, h) Gel de MEC: a 10x, i) Gel de MEC: a 40x fibras de colágena con fragmentos de tejido óseo con áreas inmaduras y maduras, j) Gel de MEC con HAp: a 4x, k) Gel de MEC con HAp: a 10x, l) Gel de MEC con HAp: a 40x tejido conectivo donde se aprecia áreas de neoformación vascular.

## 10 DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizó gel de matriz extracelular de vejiga porcina *in vivo* para evaluar la regeneración ósea. Los resultados obtenidos indican que el gel de matriz extracelular induce una neoformación de tejido óseo. Hasta el momento son muy pocas las publicaciones sobre geles de matriz extracelular para regeneración ósea. Denis y col (2016) desarrollaron geles a base de matriz extracelular ósea desmineralizada (MOD), matriz extracelular de tejido cartilaginoso (MC), hidroxiapatita (HAp) y ácido hialurónico (AH) realizando una caracterización física y evaluación *in vitro* con células mesenquimales de cordón umbilical. Obtuvieron como resultados que los materiales no produjeron citotoxicidad y pueden presentar un potencial terapéutico en una gran variedad de defectos óseos (Dennis et al., 2017), estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio.

De igual forma Townsend y col (2017) realizaron defectos críticos de 7.5 mm en calvaria de rata, utilizando geles compuestos por ácido hialurónico (AH), hidroxiapatita (HAp), matriz extracelular ósea desmineralizada (MOD) y matriz extracelular de tejido cartilaginoso (MC) con y sin la adición de factores de crecimiento (BMP-2 y VEGF), estos investigadores concluyeron que el cartílago descelularizado tiene potencial osteogénico para aplicaciones de regeneración ósea, aún sin la adición de factores de crecimiento (Townsend et al., 2017).

Por otro lado Muñoz y col (2017) realizaron un estudio en el cual evaluaron histológicamente el efecto de dos biomateriales: una membrana de matriz de submucosa de vejiga urinaria porcina (UBM) y b-fosfato tricálcico (b-TCP) en defectos óseos. Utilizaron veinte conejos macho raza Nueva Zelanda a los cuales le realizaron defectos de 5 mm en el fémur de cada uno de los modelos y posteriormente colocaron el biomaterial. Sacrificaron los modelos a las 4 y 8 semanas, observaron que tanto el biomaterial de UBM como el b-TCP mostraron la capacidad de promover la neoformación ósea, sin embargo, el biomaterial basado en

UBM produjo un tejido mejor organizado con una menor respuesta inflamatoria en comparación con el grupo de b-TCP (Abraham Muñoz-Ruiz, 2017) coincidimos con ellos ya que en el grupo de gel de matriz extracelular también se observó un tejido mayor organizado comparado con los otros grupos.

## 11 CONCLUSIÓN

- Se estableció un defecto crítico de 8 mm en calota de rata.
- Se evaluó el proceso de regeneración ósea a 12 y 16 semanas usando autoinjerto, gel de MEC y gel de MEC con HAp.
- La regeneración ósea inducida por el gel de MEC de vejiga porcina presenta mejores evidencias de regeneración ósea macroscópica, radiográfica e histológicamente.

## 12 PERSPECTIVAS

Sugerimos que para futuros trabajos se realice tomografía computarizada cone beam (CBCT) antes de la realización de la cirugía y al momento de realizar el sacrificio del modelo animal, con el fin de obtener un panorama más exacto de la formación de tejido óseo y así poder evaluar en tercera dimensión el área del defecto óseo.

Además consideramos interesante realizar la cuantificación de citocinas pro y antiinflamatorias y quimiocinas en suero para evaluar la respuesta inmunológica y el reclutamiento celular hacia el defecto óseo.

## 13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham Muñoz-Ruiz, E. S.-B., Eduardo Soto-Sainz. (2017). Evaluation of Decellularized Matrix and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate as Biomaterials for Bone Neof ormation. *In vivo Study. Int J Morphol*, 35(3), 804-811.
- Anitua. (2000). *Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRFC)*. Victoria-Spain Puesta al día en publicaciones, S.L. .
- Atala, A., Bauer, S. B., Soker, S., Yoo, J. J., & Retik, A. B. (2006). Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, 367(9518), 1241-1246. doi: 10.1016/s0140-6736(06)68438-9
- Badylak, S. F. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol*, 13(5), 377-383.
- Barrère, F., Mahmood, T. A., Groot, K. d., & Blitterswijk, C. A. v. (2008). Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 59(1-6), 38-71.
- Bissell, M. J., Hall, H. G., & Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol*, 99(1), 31-68.
- Bolland, F., Korossis, S., Wilshaw, S. P., Ingham, E., Fisher, J., Kearney, J. N., & Southgate, J. (2007). Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering. *Biomaterials*, 28(6), 1061-1070. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.10.005
- Bosch, C., Melsen, B., & Vargervik, K. (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, 9(4), 310-316.
- Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., de Carlos, A., & León, B. (2012). Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering: C*, 32(3), 478-486. doi: 10.1016/j.msec.2011.11.021
- Brown, N. H. (2011). Extracellular matrix in development: insights from mechanisms conserved between invertebrates and vertebrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a005082

- Burchardt, H. (1983). The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res*(174), 28-42.
- Catalina Estrada, A. C. P., Luis Ernesto López (2006). Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas *EIA* 5, 93-100.
- Cooper, G. M., Mooney, M. P., Gosain, A. K., Campbell, P. G., Losee, J. E., & Huard, J. (2010). Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg*, 125(6), 1685-1692. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3
- Daley, W. P., Peters, S. B., & Larsen, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci*, 121(Pt 3), 255-264. doi: 10.1242/jcs.006064
- Dennis, S. C., Whitlow, J., Detamore, M. S., Kieweg, S. L., & Berkland, C. J. (2017). Hyaluronic-Acid-Hydroxyapatite Colloidal Gels Combined with Micronized Native ECM as Potential Bone Defect Fillers. *Langmuir*, 33(1), 206-218. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b03529
- Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351.
- Farhat, W. A., Chen, J., Haig, J., Antoon, R., Litman, J., Sherman, C., . . . Yeger, H. (2008). Porcine bladder acellular matrix (ACM): protein expression, mechanical properties. *Biomed Mater*, 3(2), 025015. doi: 10.1088/1748-6041/3/2/025015
- Figueiredo, M., Fernando, A., Martins, G., Freitas, J., Judas, F., & Figueiredo, H. (2010). Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramics International*, 36(8), 2383-2393. doi: 10.1016/j.ceramint.2010.07.016
- Gil, G., Planell (2002). Biomateriales from [http://tdd.elisava.net/coleccion/20/gil\\_ginebra\\_planell-es](http://tdd.elisava.net/coleccion/20/gil_ginebra_planell-es)
- Guo, H., Su, J., Wei, J., Kong, H., & Liu, C. (2009). Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 5(1), 268-278. doi: 10.1016/j.actbio.2008.07.018

- Haider, A., Haider, S., Han, S. S., & Kang, I.-K. (2017). Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. *RSC Adv.*, 7(13), 7442-7458. doi: 10.1039/c6ra26124h
- Hench, L. L., & Polak, J. M. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science*, 295(5557), 1014-1017. doi: 10.1126/science.1067404
- Holstein, J. H., Garcia, P., Histing, T., Kristen, A., Scheuer, C., Menger, M. D., & Pohlemann, T. (2009). Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration. *J Orthop Trauma*, 23(5 Suppl), S31-38. doi: 10.1097/BOT.0b013e31819f27e5
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(10), 589-601. doi: 10.1098/rsif.2006.0124
- Karring, L., Cortellini. . (2000). Tratamiento periodontal regenerativo In I. Lindhe (Ed.), *Periodontología clínica e implantología odontológica* (pp. 605-654). Madrid: Panamericana
- Katthagen, B.-D. (2012). *Bone regeneration with bone substitutes: an animal study*: Springer Science & Business Media.
- Lang, A., Karring. (2005). *Formacion de hueso alveolar* (4th ed.). Buenos Aires: Medica Panamericana
- Lang, B., Karring. (2000). Formación de hueso alveolar. In Lindhe (Ed.), *Periodontologia clinica e implantologia odontologica* (pp. 916-948): Panamericana
- Liu, L., Li, D., Wang, Y., Xu, H., Ge, L., & Liang, Z. (2011). Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of xenogeneic (porcine) extracellular matrix (ECM) scaffold for pelvic reconstruction. *Int Urogynecol J*, 22(2), 221-227. doi: 10.1007/s00192-010-1288-9
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a005058
- Mattout. (2007). Pre and peri-implant guided bone regeneration. In A. H. In Khoury F, Missika P (Ed.), *Bone augmentation in oral implantology* (pp. 299-320): New Madden: Quintessence

- Meyer U, M. T., Handschel J, Wiesmann HP. . (2009). *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine* New York: Springer.
- Nunamaker, D. M. (1998). Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl), S56-65.
- Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E., & Pearce, S. G. (2007). Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*, 13, 1-10.
- Piccirillo, C., & PM, L. C. (2017). Calcium hydroxyapatite-based photocatalysts for environment remediation: Characteristics, performances and future perspectives. *J Environ Manage*, 193, 79-91. doi: 10.1016/j.jenvman.2017.01.071
- Silva-Benitez, E., Soto-Sainz, E., Pozos-Guillen, A., Romero-Quintana, J. G., Aguilar-Medina, M., Ayala-Ham, A., . . . Flores, H. (2015). Quantification of DNA in urinary porcine bladder matrix using the ACTB gene. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51(10), 1040-1046. doi: 10.1007/s11626-015-9927-6
- Soto-Sainz, E. (2016). *Síntesis y Evaluación de Matriz Extracelular en Gel para Regeneración Ósea*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. A., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*, 7(10), 1918-1929. doi: 10.1038/nprot.2012.113
- Swinehart, I. T., & Badylak, S. F. (2016). Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 245(3), 351-360. doi: 10.1002/dvdy.24379
- Szpalski, C., Barr, J., Wetterau, M., Saadeh, P. B., & Warren, S. M. (2010). Cranial bone defects: current and future strategies. *Neurosurg Focus*, 29(6), E8. doi: 10.3171/2010.9.FOCUS10201
- Townsend, J. M., Dennis, S. C., Whitlow, J., Feng, Y., Wang, J., Andrews, B., . . . Berkland, C. J. (2017). Colloidal Gels with Extracellular Matrix Particles and Growth Factors for Bone Regeneration in Critical Size Rat Calvarial Defects. *AAPS J*, 19(3), 703-711. doi: 10.1208/s12248-017-0045-0
- Voytik-Harbin SL, A. O. B. (1998). Small intestinal submucosa: A tissue derived

extracellular matrix that promotes tissue-specific growth and differentiation of cells in vitro. *Tissue Eng*, 4, 157-174. .

Xiong, Y., & Wan, L. (2008). [Preparation and characterization of an extracellular matrix of artificial tendon tissue from natural macromolecules]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 24(11), 1907-1911.