

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



**EVALUACIÓN DE BIOANDAMIOS CON POTENCIAL INDUCTOR DE  
LA REGENERACIÓN ÓSEA**

**No. De registro 2024-2**

**TESIS QUE PRESENTA:**  
**CD. PAOLA OCHOA ANDRADE**

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

**DIRECTORES DE TESIS:**  
**DRA. ELSA MARIBEL AGUILAR MEDINA**  
**DR. HIPÓLITO CASTILLO URETA**

**FEBRERO 2024, CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO.**



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución·No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## DEDICATORIA

Este trabajo de tesis es dedicado a mis padres **Ignacio Ochoa Álvarez** y **Ana Rosa Andrade Parra** que son mi motor y mi pilar más importante, por creer en mí y apoyarme siempre, tanto económica como emocionalmente. Gracias por permitirme alcanzar esta meta, que no habría sido posible sin ustedes y por estar presente en todo momento, impulsándome a ser mejor persona y profesionalista. Los admiro por su fortaleza y estoy orgullosa de lo que han logrado. Son mi ejemplo a seguir y mi inspiración. Los amo mucho.

También dedico esta tesis a mi mayor pilar emocional, mi novio **Noé de Jesús Jacquez Loaiza**, quien me acompañó durante todo este proceso, motivándome y siempre demostrándome lo orgulloso que está de mí. Sin duda tenerlo como compañero de vida, me ayudó a sobrellevar los momentos más difíciles.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Sinaloa por permitirme ser parte de ella y al Posgrado de Endodoncia por haberme abierto las puertas para poder estudiar mi especialidad y avanzar en mi carrera profesional.

A el cuerpo académico que conforma el Posgrado por formarme tanto en lo académico como en lo clínico, y a Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar por alentarnos a seguir adelante y confiar en nuestras aptitudes.

Agradezco también a mi directora de tesis, Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina, por confiar en mí para la realización de este proyecto y por su dedicación y apoyo para finalizarlo.

A mis asesores académicos, Dr. Rosalío Ramos Payán, Dr. Alfredo del Rosario Ayala Ham, Dr. Jorge López Gutiérrez, por su asesoría durante la realización de la tesis y Dr. Julio César Basurto Flores por su gran apoyo en el análisis histológico.

Quiero agradecer a mis compañeros y amigos de la octava generación, que se convirtieron en mi familia, con quienes compartí conocimientos, alegrías, experiencias y muchos desvelos durante este largo y retador camino. Gracias porque hicieron más amenos estos 2 años y medio.

Finalmente, a Conahcyt por otorgar apoyo económico a tantos jóvenes que hoy en día quieren realizar estudios de posgrado, siendo yo un beneficiario con el número de beca 1143631.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	VII
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. MARCO TEÓRICO .....	6
1.1.1 Tejido óseo.....	6
1.1.2 Regeneración ósea .....	7
1.1.3 Defecto óseo .....	8
1.1.4 Ingeniería de tejidos .....	8
1.1.5 Andamios .....	9
1.1.6 Injerto óseo .....	10
1.1.7 Hidrogeles .....	13
1.1.8 Modelos de defectos óseos .....	14
1.2 ANTECEDENTES.....	18
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	20
1.4. HIPÓTESIS .....	21
1.5. OBJETIVOS.....	22
1.5.1 Objetivo general.....	22
1.5.2 Objetivos específicos .....	22
2. MATERIAL Y MÉTODOS .....	23
2.1. Lugar de realización del estudio.....	23
2.2. Tipo de estudio.....	23
2.3. Modelo de estudio.....	23
2.4. Muestra .....	25
2.4.1. Lugar de obtención de la muestra.....	25
2.4.2. Tamaño de la muestra .....	25
2.4.3. Criterios de inclusión .....	25
2.4.4 Criterios de exclusión .....	25
2.4.5. Criterios de eliminación .....	26
2.4.6. Cuidado y manejo de ratas Wistar .....	26

<b>2.5. Metodología</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.1. Obtención de los materiales a evaluar</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.2. Procedimiento</b> .....	<b>31</b>
<b>2.5.3. Análisis histológico</b> .....	<b>48</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1. bECMh tiene capacidad para la regeneración ósea <i>in vivo</i></b> .....	<b>49</b>
<b>3.2. Evaluación macroscópica</b> .....	<b>49</b>
<b>3.3. Evaluación histológica</b> .....	<b>51</b>
<b>3.3.1. Grupo 1. bECMh</b> .....	<b>52</b>
<b>3.3.2. Grupo 2. Autoinjerto</b> .....	<b>55</b>
<b>3.3.3 Grupo 3. Control negativo</b> .....	<b>58</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>61</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>62</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rata de laboratorio.....	24
Figura 2. Calota. ....	28
Figura 3. Calota triturada.....	28
Figura 4. Hidrogel.....	30
Figura 5. Mesa de trabajo y material.....	32
Figura 6. Selección de instrumental.....	33
Figura 7. Infiltrado de Anestesia.....	35
Figura 8. Tricotomía.....	37
Figura 9. Elevación de colgajo.....	39
Figura 10. Inducción de defecto crítico.....	40
Figura 11. Defecto óseo.....	42
Figura 12. Colocación de materiales.. ....	43
Figura 13. Sutura.....	44
Figura 14. Obtención de muestra.....	46
Figura 15. Necropsia.....	47
Figura 16. Evaluación de injertos in vivo.....	50
Figura 17. Evaluación histológica 4x. bECMh.....	52
Figura 18. Evaluación histológica 10x. bECMh.....	53
Figura 19. Evaluación histológica 40x. bECMh.....	54
Figura 20. Evaluación histológica 4x. Autoinjerto.....	55
Figura 21. Evaluación histológica 10x. Autoinjerto.....	56
Figura 22. Evaluación histológica 40x. Autoinjerto.....	57
Figura 23. Evaluación histológica. Control negativo.....	58

## RESUMEN

**Introducción:** La pérdida de tejido óseo es un problema frecuente por lo que comúnmente se utilizan injertos como terapia. La terapia más frecuente es el autoinjerto, sin embargo, el uso de hidrogeles de matriz extracelular, han demostrado numerosos beneficios, ya que pueden solidificar *in situ* permitiendo abordar áreas complicadas, se adaptan eficazmente a la forma del defecto y proporcionan un ambiente excelente para la regeneración y proliferación celular, no obstante, existen pocos estudios enfocados en regeneración ósea. **Objetivo:** Evaluación de diferentes bioandamios con potencial inductor de la regeneración ósea. **Materiales y métodos:** Se realizó un defecto crítico en calota de 3 ratas Wistar machos. Grupo 1 se colocó hidrogel de matriz ósea (bECMh); Grupo 2 se colocó autoinjerto; Grupo 3 se usó como control negativo (sin tratamiento). Se realizó evaluación macroscópica e histológica a las 16 semanas del acto quirúrgico. **Resultados:** Se observó mayor regeneración ósea en el grupo de bECMh comparado con los demás grupos. **Conclusiones:** El bECMh presenta mejores resultados de regeneración ósea macroscópica e histológicamente.

**Palabras clave:** Hidrogel de matriz ósea, regeneración ósea, andamios, matriz extracelular.



## ABSTRACT

**Introduction:** Bone tissue loss is a common problem, which is why grafts are commonly used as therapy. The most common therapy is autograft, however, the use of extracellular matrix hydrogels has shown numerous benefits, since they can be formed *in situ* allowing complicated areas to be addressed, they adapt effectively to the shape of the defect and provide an excellent environment for regeneration and cell proliferation, however, there are few studies focused on bone regeneration. **Objective:** Evaluation of different bioscaffolds with the potential to induce bone regeneration. **Materials and methods:** A critical defect was made in the calvaria of 3 male Wistar rats. Group 1 was placed with bone matrix hydrogel (bECMh); Group 2 received an autograft; Group 3 was used as a negative control (no treatment). Macroscopic and histological evaluation was performed 16 weeks after surgery. **Results:** Greater bone regeneration was observed in the bECMh group compared to the other groups. **Conclusions:** bECMh presents better bone regeneration results macroscopically and histologically.

**Keywords:** Bone matrix hidrogel, bone regeneration, scaffolds, extracelular matrix.

## 1. INTRODUCCIÓN

La pérdida de tejido óseo se relaciona con la edad y con las condiciones patológicas, constituye algunas de las deficiencias más frecuentes en este tejido. Por lo general, esto conlleva a un proceso de curación prolongado y, en algunos casos, a recidivas, dado que el tratamiento no alcanza el lugar específico de acción. Las terapias actuales para este tipo de defectos comúnmente implican el uso de injertos óseos o la aplicación de implantes protésicos metálicos (1).

La ingeniería de tejidos se fundamenta en el uso de células, señales y andamios. Las células se siembran tridimensionalmente en un andamio, se cultivan en un entorno *in vitro* y se complementan con las señales necesarias. Luego, se implanta en un organismo como una prótesis *in vivo* (2).

Los andamios pueden estar fabricados con materiales poliméricos sintéticos o absorbibles, de origen natural, biológicos, degradables o no degradables. Se han empleado diversas técnicas para la construcción de andamios, pero los cuatro principales enfoques de andamiaje comprenden el uso de láminas de células secretoras de matriz extracelular (ECM), andamios porosos prefabricados a partir de biomateriales sintéticos, naturales y biodegradables, andamios de ECM descelularizados, y células atrapadas en hidrogeles (3).

La terapia de implantación más frecuentemente empleada es mediante autoinjertos, donde se obtienen muestras de tejido del propio cuerpo del paciente para minimizar el riesgo de rechazo. No obstante, esta forma de tratamiento se encuentra limitada en muchos de los casos debido a la morbilidad asociada al sitio donante, los extensos periodos de recuperación y el daño significativo al tejido resultante de la intervención quirúrgica (4).

Otra alternativa que podemos encontrar es la utilización de hidrogeles, los cuales han demostrado numerosos beneficios en el ámbito de la ingeniería de tejidos. Estos hidrogeles, compuestos por matriz extracelular, son especialmente atractivos para su aplicación en defectos óseos. Su ventaja distintiva radica en que pueden formarse *in situ* permitiendo abordar fácilmente áreas complicadas con procedimientos menos invasivos, formando un compuesto, que se adapta de manera eficaz a la geometría y la forma del defecto, proporcionando un entorno excelente para la regeneración y proliferación celular. Los hidrogeles se pueden utilizar para rellenar defectos óseos de extensiones críticas y lesiones en sitios que no soportan carga, aunque no tengan la resistencia mecánica necesaria (5).

Los órganos dentales son estructuras complejas conformadas por diversos elementos que poseen características y funciones arquitectónicas particulares. Tanto la corona como la raíz están constituidas por distintos tejidos mineralizados que recubren un tejido blando, la pulpa dental. La raíz se encarga de fijar el diente al tejido óseo circundante mediante fibras conocidas como ligamento periodontal, las cuales se insertan tanto en el cemento de la raíz como en el hueso (6).

Los dientes son susceptibles a sufrir deterioros, principalmente debido a caries, enfermedades periodontales y traumatismos. En todas estas situaciones, los microorganismos desencadenan infecciones e inflamaciones. Actualmente, existen en odontología métodos y materiales avanzados, donde la mayoría de las terapias se centran en la sustitución de estructuras dañadas o perdidas. Esto permite mejorar las estrategias de tratamiento, las cuales pueden ser más específicas, menos invasivas y orientadas a la curación y regeneración de tejidos (6).

Ya que los microorganismos que penetran en el hueso perirradicular a través del agujero apical desencadenan una respuesta inflamatoria y, posteriormente, una lesión ósea, es crucial revertir este proceso para alcanzar la curación. En el tratamiento de

endodoncia, las estrategias antibacterianas se enfocan en la eliminación o, al menos, la drástica reducción de los microorganismos dentro del sistema de conductos radiculares para facilitar la recuperación. No obstante, las condiciones crónicas o sistémicas afectan de manera negativa el potencial de curación (6).

Las lesiones periapicales son consideradas como una respuesta de defensa del organismo para evitar la expansión de infecciones bacterianas desde el conducto radicular hacia los tejidos circundantes (6).

## **1.1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1.1 Tejido óseo**

El hueso es un tejido que desempeña un papel fundamental en el cuerpo humano, ya que posee múltiples funciones esenciales, entre las cuales se pueden mencionar, proporcionar soporte muscular y estructural, garantizar la protección física de los órganos internos, facilitar la carga para el movimiento y la locomoción, así como el suministro de diferentes minerales como el calcio y el fósforo (7). Desempeña también, importantes funciones hematopoyéticas e inmunológicas como sitio de generación de células sanguíneas y diferenciación de células inmunitarias (2). Además, posee propiedades distintivas representadas por una resistencia elevada y una notable capacidad de regeneración, lo que permite que el hueso se recupere completamente cuando se presentan las condiciones óptimas para este proceso (8).

Además de su función fundamental de brindar rigidez estructural y soporte al cuerpo, el tejido óseo alberga médula ósea, desempeñando un papel importante en el mantenimiento de las células madre y siendo la fuente de origen de todos los componentes celulares de la sangre. La hematopoyesis ocurre principalmente en el microambiente especializado de la médula ósea, donde se encuentran los nichos de células madre hematopoyéticas. Además de estas células, la médula ósea contiene osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, además de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BMSC), adipocitos y células endoteliales vasculares (9).

Los osteoblastos, los osteoclastos y los osteocitos constituyen los tres principales tipos de células presentes en el tejido óseo. Los osteoblastos, derivados de las células madre mesenquimales (MSC), son células formadoras de hueso que recubren las superficies óseas o maduran y se convierten en osteocitos. Estos últimos, están rodeados de tejido óseo y ayudan a regular el crecimiento, la reparación y la descomposición del hueso. Por otro lado, los osteoclastos, derivados de células progenitoras de osteoclastos, son células encargadas de la reabsorción ósea. Tras

sufrir lesiones, los huesos cuentan con la capacidad intrínseca de curación gracias a la señalización celular entre estos tipos de células y la densa vascularización (10).

### **1.1.2 Regeneración ósea**

La regeneración ósea es un proceso complejo mediante el cual se sustituye tejido óseo, ya sea en situaciones fisiológicas o patológicas. Los osteoblastos son las células activas principalmente implicadas en el proceso, los cuales son responsables de la formación del hueso; y los osteoclastos, encargados de la reabsorción del mismo (7). Éstos están coordinadamente bajo la influencia de receptores presentes en los osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y sus precursores, los cuales regulan una amplia variedad de proteínas que estimulan o inhiben los procesos de formación y reabsorción ósea (11).

El proceso de la regeneración ósea se presenta tanto en entornos fisiológicos como patológicos. En situaciones fisiológicas, el proceso es conocido como remodelación, siendo más activo durante el crecimiento y reemplazando el esqueleto aproximadamente cada 10 años durante la adultez (7). En contraste, en entornos patológicos, la regeneración ósea se manifiesta en la curación de fracturas o reparación de defectos óseos posterior a infecciones y resecciones de tumores óseos, en patologías maxilofaciales, osteointegración de implantes ortopédicos y dentales, así como en enfermedades periodontales (12).

Cuando se cumplen las condiciones adecuadas, la regeneración ósea puede resultar en la curación completa de defectos óseos, sin diferencias apreciables entre el hueso recién formado y el existente previamente a la lesión. Sin embargo, en algunos casos, en presencia de enfermedades sistémicas, factores genéticos y un estilo de vida deficiente, la regeneración ósea puede ser insuficiente o inadecuada, ocasionando fracasos, retrasos en la curación y complicaciones. Estos escenarios pueden requerir

múltiples intervenciones quirúrgicas, periodos prolongados de hospitalización, bajas tasas de satisfacción y consecuencias socioeconómicas significativas (11).

En tales situaciones, a menudo se requieren factores exógenos para mejorar el proceso de regeneración ósea, utilizando técnicas tanto locales como sistémicas (7). Las técnicas locales actuales para potenciar el proceso de regeneración ósea incluyen el uso de injertos óseos autólogos, aloinjertos, estructuras osteoconductoras, factores de crecimiento, células osteoprogenitoras, entre otros (13).

### **1.1.3 Defecto óseo**

Los defectos óseos constituyen condiciones críticas en las que una porción del tejido óseo se ve afectada o ausente por diferentes razones, tales como traumatismos, trastornos genéticos, infecciones, tumores, enfermedades, intervenciones quirúrgicas, entre otras, requiriendo su reparación mediante enfoques intervencionistas, como los injertos óseos (2). En este escenario, se utilizan diversos modelos animales con el propósito de abordar y analizar estas situaciones (14).

### **1.1.4 Ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejidos constituye un campo de investigación multidisciplinario que utiliza células madre, andamios, estímulos bioquímicos y biomecánicos con el propósito de desarrollar biomateriales biomiméticos que satisfacen los requisitos fundamentales para el desarrollo de tejidos *in vitro* o *in vivo* (15) (16).

Con base a las propiedades físicas del hueso, numerosos estudios en el campo de la ingeniería de tejidos evalúan sus resultados mediante mediciones de volumen óseo y la formación y densidad del tejido mineralizado (2). Estas mediciones se llevan a cabo mediante técnicas como radiografías o análisis tomográficos (17). Además, se recurre comúnmente a técnicas histológicas para examinar la formación de tejido

mineralizado, la integración con el huésped, la identificación de los componentes celulares, así como la respuesta inflamatoria del huésped a las construcciones de ingeniería de tejido implantado (18).

Las diversas técnicas en el campo de la ingeniería de tejido óseo y la medicina regenerativa pueden aplicarse también para investigar el complejo órgano óseo, tanto en su estado normal, como en enfermedad (2). Recientemente, se han desarrollado diferentes modelos *in vivo* que emplean enfoques de regeneración de tejidos con el objetivo de imitar las condiciones fisiológicas de un hueso funcionalmente íntegro. Se han “humanizado” ratones, generando tejido que se asemeja lo más posible al humano dentro del huésped murino. Esto facilita el estudio de los mecanismos específicos de neoplasias malignas que afectan a la especie humana (18).

La ingeniería del tejido óseo representa una opción terapéutica alternativa para abordar los defectos óseos y desarrollar el trasplante de órganos sin necesidad del uso de injertos autólogos o alogénicos. Las MSCs, en particular las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BM-MSCs) y las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AD-MSCs), son las fuentes principales de células utilizadas en la ingeniería de tejido óseo (BTE) (15)

### **1.1.5 Andamios**

Los andamios representan uno de los tres elementos esenciales en la ingeniería de tejido óseo. El término “andamio” abarca diversos materiales, tanto sintéticos como naturales, que ofrecen una plataforma necesaria para guiar las células implantadas, estimular la adhesión y reproducción celular en el proceso de regeneración de tejidos y órganos. Estos andamios también desempeñan la función de transportar factores de crecimiento y estímulos (15). Un andamio óptimo debe mantenerse estructuralmente estable hasta que se produzca la formación del nuevo tejido y debe proporcionar un entorno apropiado para permitir la proliferación celular. Además, es fundamental que



carezca de cualquier restricción inmunogénica o tóxica. El objetivo en el diseño de andamios consiste en desarrollar estructuras capaces de proporcionar una señalización celular e imitar el entorno natural de los tejidos (19).

Las construcciones de ingeniería de tejidos (TEC) suelen estar compuestas de un andamio biocompatible que imita la estructura ósea nativa, células osteogénicas como osteoblastos o células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSC) que pueden poblar el andamio y generar nuevo tejido óseo, y de factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) que transmiten señales a las células circundantes, estimulando la formación de una nueva matriz ósea mineralizada y vascularizar del área (2) (20) (21).

#### **1.1.6 Injerto óseo**

Uno de los diversos enfoques para abordar defectos óseos consiste en reemplazar el tejido defectuoso mediante la implantación de biomateriales derivados tanto de fuentes naturales como sintéticas. En la última década se han explorado métodos de ingeniería tisular y medicina regenerativa con la finalidad de regenerar y reparar huesos lesionados, siendo este procedimiento conocido como injerto óseo, aplicado directamente en la zona afectada (14).

El hueso es un tejido conectivo mineralizado altamente dinámico, ya que experimenta una remodelación constante a través de la interacción entre osteoclastos y osteoblastos. Por lo tanto, en cualquier enfoque de tratamiento de trasplante se debe de considerar tanto la pérdida de integridad estructural como la circulación de células vivas (14).

Un sustituto de injerto óseo idealmente debe cumplir con ciertos criterios, entre ellos, ser biocompatible, bioabsorbible, osteoinductivo, osteoconductor, tener una estructura similar a la del hueso y ser rentable (14).

#### **1.1.6.1 Autoinjerto**

Los autoinjertos se pueden definir como el estándar de oro para la regeneración ósea (15). Sin embargo, las posibilidades de tratamiento se ven limitadas por la cantidad de hueso disponible en el área donante para luego ser trasplantado a la región afectada (13). Este enfoque conlleva complicaciones entre las que se incluyen, la morbilidad en el sitio de extracción, la formación de hematomas locales y desafíos en la remodelación del hueso implantado (22) (23) (24).

Además, el autoinjerto no es adecuado para la reconstrucción de defectos extensos y presenta múltiples riesgos, como dolor, infección y cicatrización de heridas (15). Asimismo, en ciertos escenarios, podría existir una disponibilidad naturalmente restringida de injerto, como puede suceder en situaciones clínicas que involucran a pacientes pediátricos (13) (14).

#### **1.1.6.2 Aloinjerto**

Se le puede definir como un injerto que se obtiene de un ser vivo diferente al que va a recibir dicho injerto, siendo éste, de la misma especie. Los aloinjertos pueden ser una opción viable en situaciones donde no es factible realizar un procedimiento quirúrgico de autoinjerto (25). Durante la selección de estos materiales, es crucial tener en cuenta dos elementos fundamentales: la estabilidad mecánica y la interacción biológica con el hueso receptor, facilitando así la adecuada cicatrización de la lesión (14).

El empleo de aloinjertos se encuentra limitado u obstaculizado debido a la integración del tejido óseo del receptor, así como por desafíos en la vascularización y el riesgo de

transmisión de enfermedades mediadas por el sistema inmunológico (13) (2) . En este sentido, se han puesto en marcha distintos tipos de tratamientos para reducir el rechazo inmunológico por parte de los aloinjertos y la disponibilidad restringida en el caso de autoinjertos, actualmente está en crecimiento es el uso de andamios caracterizados de manera tridimensional los cuales pueden ser obtenidos de diversas fuentes naturales descelularizadas, tales como hueso o hasta pericardio.

### **1.1.6.3 Matriz ósea desmineralizada**

La matriz ósea desmineralizada (DBM) ha sido desarrollada como una opción terapéutica alogénica al autoinjerto, siendo especialmente relevante para tratar defectos óseos en extremidades, columna vertebral y la región craneofacial. Este producto se somete a un proceso de descalcificación mediante una solución ácida para eliminar los componentes minerales, mientras conserva el colágeno (principalmente tipo I con algunos tipos IV y X), proteínas no colágenas y factores de crecimiento osteoinductivos, como las proteínas morfogénicas óseas (BMP). Asimismo, contiene porcentajes variables de mineral de fosfato de calcio residual (1%–6%) y pequeñas cantidades de desechos celulares (26).

Después de la descalcificación, las BMP pueden liberarse de los componentes minerales circundantes, manifestando plenamente su potencial osteoinductivo. Las proteínas de colágeno que permanecen en la DBM pueden proporcionar una estructura tridimensional para el crecimiento y desarrollo de capilares, tejido perivascular, así como células osteoprogenitoras del huésped en el injerto. Por lo tanto, se ha evidenciado que la DBM funciona como un sustituto osteoconductor y osteoinductivo. Además, el uso de hueso alogénico en la reconstrucción ósea mediante DBM implica la eliminación de las células originales y posibles bacterias, lo que podría disminuir los riesgos de rechazo inmunológico e infección (26).

Las ventajas asociadas al empleo de DBM en la reconstrucción ósea incluyen: la ausencia de restricciones en la cantidad de injerto, dado que la fuente de donantes es abundante; la potencial disminución de complicaciones vinculadas a la recolección de autoinjertos del sitio donante; y la capacidad para reducir tanto el tiempo de intervención como el periodo de recuperación (26).

Aunque existen evidencias sustanciales que respaldan la eficacia de la DBM para reparar defectos óseos, actuar como material de relleno y estimular el crecimiento de hueso nuevo, los productos finales en diversas presentaciones presentan desafíos en su manejo por parte de los profesionales. Esto se debe a que el polvo o las partículas de DBM pueden tener una estructura suelta, lo que podría dificultar su retención en el sitio de aplicación y aumentar la posibilidad de dispersión durante la intervención debido a la irrigación y el flujo sanguíneo (27). Por otra parte, la utilización de materiales preformados para el relleno puede dar lugar a espacios muertos debido a la inconsistencia del material de reparación y la forma del defecto, lo que resulta en una falta de unión o un retraso en el proceso de cicatrización (26). Es por esto, que otra alternativa que podemos encontrar, son los hidrogeles, los cuales exhiben propiedades adecuadas como andamio.

### **1.1.7 Hidrogeles**

El hidrogel es una especie de sistema de red de polímeros que utiliza agua como medio de dispersión, presentando una alta proporción de agua en su matriz. Éste es insoluble en agua debido a una estructura reticulada especial. A su vez, los hidrogeles comparten similitudes en propiedades físicas y químicas con muchos tejidos humanos, ya que están compuestos por polisacáridos y proteínas. Los hidrogeles no suelen interferir con los procesos metabólicos del cuerpo, permitiendo el paso de metabolitos a través de ellos para su excreción (5). Cumplen una función crucial en la regulación de procesos celulares como la migración y la transmisión de señales a través de la unión a receptores de la membrana celular. Adicionalmente, los hidrogeles tienen la capacidad de absorber agua, reduciendo la fricción y los impactos mecánicos en los

tejidos circundantes. Por lo tanto, gracias a su degradabilidad controlable, biocompatibilidad y buenas propiedades mecánicas, los hidrogeles ofrecen perspectivas amplias de aplicación (28).

Los hidrogeles exhiben propiedades homogéneas basadas en agua que permiten encapsular, manipular y transferir su contenido al tejido circundante, de una manera mínimamente invasiva (1).

#### **1.1.7.1 Hidrogel de matriz extracelular ósea**

Los andamios de matriz extracelular (ECM) son ampliamente empleados en la ingeniería de tejidos debido a sus características nativas bien preservadas. Estos andamios descelularizados son comúnmente de origen porcino o bovino, mantienen la estructura bioquímica, nanoestructura y propiedades bioinductivas de la matriz nativa, conservan proteínas estructurales y funcionales como glicosaminoglicanos, proteoglicanos y proteínas de crecimiento y se utilizan extensamente en diversas aplicaciones de ingeniería de tejidos, como en tratamiento de lesiones isquémicas en tejidos blandos de ratas (29). Existen diferentes modelos de investigación para resolver esta problemática tan compleja como lo es la regeneración ósea.

#### **1.1.8 Modelos de defectos óseos**

Existen diversas opciones de modelos animales empleados para estudiar los injertos óseos, siendo los cuatro principales, los modelos de defecto calvarial, hueso largo o defecto segmentario, defecto cortical parcial y defecto del hueso esponjoso (30). En particular, los defectos segmentarios y calvariales son los más extensamente descritos y utilizados en la literatura (2).

### **1.1.8.1 Modelos de defecto calvarial**

La creación de un defecto óseo calvarial se lleva a cabo típicamente en especies de roedores debido a su capacidad continua de remodelar su esqueleto a lo largo de su vida, manteniendo abiertas las placas de crecimiento durante la edad adulta (31).

El procedimiento implica una incisión sagital en el cuero cabelludo del roedor, seguida por la elevación de un colgajo para exponer el hueso de la bóveda craneal. Se crea un defecto óseo circular estandarizado que abarca toda la profundidad del hueso, generalmente el hueso parietal, utilizando una fresa de trépano con irrigación salina para prevenir posibles daños en el hueso huésped circundante. El fragmento óseo retirado se extrae con precaución para evitar daños en la duramadre. Luego se coloca nuevamente el periostio y se cierra el colgajo de piel suprayacente mediante suturas (31).

Estos modelos han sido utilizados para evaluar diversos andamios de ingeniería tisular (TE), que incluyen tanto materiales sintéticos como naturales, con y sin la presencia de células y factores de crecimiento como BMP (31) (2).

#### **1.1.8.1.1 Consideraciones al utilizar defecto calvarial**

Cuando se crea cualquier modelo de defecto óseo, la dimensión del defecto inducido, en especial el denominado defecto de tamaño crítico (CSD), juega un papel crucial. En el caso de ratas, ha habido controversias sobre cuáles son las dimensiones óptimas del CSD (2).

Para definir un CSD en la bóveda craneal de las ratas, se ha optado comúnmente por defectos con un diámetro de 5 mm. Bosch *et al.* demostraron que después de un periodo de 12 meses, se observó una formación ósea mínima en los bordes de los defectos en ratas (2).

Los autores concluyeron que las ventajas de utilizar un defecto de 5 mm radican en la capacidad de inducir dos defectos por animal y en evitar la necesidad de una sutura sagital que atraviese el defecto. Sin embargo, algunos defienden la utilización de defectos de 8 mm como CSD para ratas, argumentando que Hollinger *et al.* mostraron aproximadamente un 10% de formación ósea de *novoo* después de 13 meses en defectos de 5 mm, lo cual no cumple con los criterios aceptados para ser clasificado como CSD. En el caso de ratones, se consideran CSD los defectos de 4 mm, aunque se han reportado tamaños tanto más grandes como más pequeños (31). Además, es evidente que la edad y la raza del animal, también influye en la determinación del CSD tanto en ratones como en ratas (2).

#### **1.1.8.1.2 Ventajas y desventajas de modelos en calvarial**

Entre las ventajas que ofrecen los modelos de roedores se incluye que son económicos, fáciles de manejar y una preocupación social limitada. El uso del modelo calvarial ha posibilitado la evaluación de diversos biomateriales, permitiendo comparaciones efectivas de las disparidades entre diferentes andamios de ingeniería tisular (2).

Una limitación del modelo calvarial radica es su incapacidad para evaluar el desempeño de los biomateriales de ingeniería tisular frente a cargas mecánicas fisiológicas, aspecto crucial en ciertas aplicaciones clínicas de ingeniería tisular ósea, como la regeneración de huesos que soportan carga. Además, los modelos de roedores resultan menos adecuados para investigaciones a largo plazo que requieran múltiples biopsias o muestras de sangre, debido a su corta vida útil y a los volúmenes de tejido y sangre relativamente reducidos en comparación con especies de mayor tamaño, como ovejas y cerdos, así como en comparación con humanos (2).

Asimismo, en el contexto de la aplicación clínica, los modelos de roedores presentan limitaciones al abordar preguntas destinadas a evaluar la eficacia de la estrategia TE,

dado que exhiben patrones distintos de carga esquelética (31). Para superar estas restricciones, se pueden emplear defectos óseos segmentarios en huesos largos de animales de mayor tamaño como una alternativa que simula de manera más cercana el entorno clínico (2).



## 1.2 ANTECEDENTES

La utilización de matriz ósea desmineralizada (DBM) se remonta a 1889, cuando Senn realizó la primera aplicación de DBM derivada de tibias bovinas impregnadas con ácido clorhídrico para reparar defectos en cráneo y huesos largos en seres humanos (26). En 1965, Urist *et al.* lograron con éxito el trasplante de DBM humano para tratar defectos en huesos largos y columna lumbar. Desde entonces, el empleo de DBM va en aumento en cirugías ortopédicas, y se han llevado a cabo numerosas investigaciones para explorar la capacidad de regeneración ósea de la DBM como un material para la sustitución ósea (32).

Uno de los primeros ejemplos en la historia de la ingeniería de tejidos se remonta a 1933, cuando Bisceglie implantó una membrana que contenía células tumorales de ratón en la cavidad abdominal de un cerdo. En este experimento, se observó que la membrana actuaba como un protector, resguardando las células tumorales de las respuestas inmunitarias al implante. Desde entonces, gracias a los avances en biología celular, ciencia de los materiales y medicina, se ha logrado un progreso significativo en la utilización de células y andamios para la creación de tejidos musculoesqueléticos funcionales (10)

Hudieb y cols. compararon defectos óseos de tamaño crítico en el hueso calvarial en ratas de 22 a 24 meses y de 11 a 12 semanas de edad. De manera aleatoria se realizaron defectos óseos de 3 mm, 4 mm, 5 mm y 7 mm, y evaluaron los resultados a 4 y 8 semanas mediante análisis histológicos y radiográficos. Los hallazgos indicaron que las ratas jóvenes exhibieron mayores volúmenes óseos, un mayor porcentaje de cierre de defectos y una mayor densidad de hueso formado. Observaron que el cierre del defecto solo se logró en defectos de 3 mm en ambos grupos después de 8 semanas. No obstante, los defectos de 4 mm mostraron formación de puentes óseos después de 8 semanas únicamente en las ratas jóvenes. Este estudio confirmó que un defecto de 5 mm se considera crítico para defectos óseos de calota en ratas adultas

jóvenes; sin embargo, un defecto de 4 mm puede considerarse crítico en ratas mayores a 8 semanas de edad (33).

Dennis y cols. desarrollaron geles utilizando matriz extracelular ósea desmineralizada (MOD), matriz extracelular de tejido cartilaginoso (MC), hidroxiapatita (HAp) y ácido hialurónico (AH). Llevaron a cabo una caracterización física y una evaluación *in vitro* con células mesenquimales de cordón umbilical y los resultados obtenidos indicaron que estos materiales no generaron citotoxicidad y demostraron así, su potencial terapéutico en diversos tipos de defectos óseos (23).

### **1.3. JUSTIFICACIÓN**

En el área de la salud es muy común encontrar lesiones que afectan la salud bucal, principalmente el tejido óseo, por lo que es sumamente importante contar con diferentes biomateriales con la capacidad de restaurar la pérdida ósea para recuperarlo estructuralmente y que continúe con su función.

Dada la necesidad de regenerar los defectos de este tejido, se realizan investigaciones del funcionamiento de distintos biomateriales para la regeneración ósea, y para lograr evaluar tanto su eficacia como su biocompatibilidad, por lo que es necesario probarlo en modelos experimentales antes de realizar estudios clínicos.

Los injertos óseos buscan imitar el entorno natural del tejido, es por eso que proponemos utilizar el autoinjerto por ser el estándar de oro en regeneración ósea y, el hidrogel de matriz ósea, ya que se ha demostrado su capacidad biológica, esto con la finalidad de evaluar su potencial regenerativo del tejido óseo.

#### **1.4. HIPÓTESIS**

El hidrogel de matriz ósea promueve mayor formación de tejido mineralizado en comparación con el autoinjerto en un defecto crítico *in vivo*.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1 Objetivo general**

Evaluar bioandamios con potencial inductor de la regeneración ósea.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el proceso de regeneración ósea en modelo animal *in vivo*.
- Comparar histológicamente la regeneración ósea de los injertos.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Lugar de realización del estudio**

Este estudio fue realizado en los Laboratorios de Inmunología y de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, Boulevard Universitarios y Avenida de las Américas S/N, CP. 80010. Culiacán, Sinaloa, México.

### **2.2. Tipo de estudio**

Experimental *in vivo*, comparativo, transversal, prospectivo.

### **2.3. Modelo de estudio**

Un total de 3 ratas machos adultas de cepa Wistar (Figura 1) fueron utilizadas 1 por cada grupo; grupo de experimentación (bECMh), grupo control positivo (autoinjerto) y grupo control negativo.



**Figura 1. Rata de laboratorio.** Modelo murino cepa *Rattus norvegicus albinus* (Wistar).

## **2.4. Muestra**

### **2.4.1. Lugar de obtención de la muestra**

Las biopsias se obtuvieron en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa

### **2.4.2. Tamaño de la muestra**

Se realizó evaluación de regeneración ósea en calota con los siguientes grupos experimentales:

- Grupo 1: Hidrogel de matriz ósea desmineralizada (bECMh)
- Grupo 2: Control positivo (autoinjerto)
- Grupo 3: Control negativo (sin tratamiento)

Se utilizó 1 ejemplar para cada grupo.

### **2.4.3. Criterios de inclusión**

- Ratas Wistar macho aparentemente sanas.
- 3 meses de edad.
- Peso aproximado entre  $300 \pm 50$  gramos, al inicio del experimento.

### **2.4.4 Criterios de exclusión**

- Ratas Wistar hembra
- Animales desnutridos y deshidratados
- Ratas que muestren inquietud en el área operatoria



#### **2.4.5. Criterios de eliminación**

- Ratas a las que no se les pueda realizar la cirugía.
- Ratas que sufran infección después de la intervención.
- Ratas que mueran durante el estudio.

#### **2.4.6. Cuidado y manejo de ratas Wistar**

Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud-2014 y las normas de salud NOM-062-ZOO1999, las cuales buscan:

- Evitar al máximo el sufrimiento de los animales.
- Usar procedimientos que garanticen muerte sin sufrimiento.
- Proporcionar máximo de comodidad, excepto cuando las variables experimentales lo justifiquen.
- Proteger al personal de laboratorio involucrado.

Para ello se diagnosticaron las ratas de laboratorio sin signos de enfermedad, conducta anormal, dolor y sufrimiento. Se proporcionó alimento estéril y agua purificada *ad libitum*, condiciones de temperatura y ventilación adecuadas, y fueron agrupados de acuerdo con las condiciones y necesidades que se requirieron.

Las jaulas donde se alojaron contaron con registros para adecuado control y se acondicionó con aserrín favoreciendo su aislamiento térmico y construcción de nido, garantizando así la absorción de su orina, excremento, desperdicio de agua y facilitar la desinfección. La limpieza de las jaulas se realizó de manera periódica y los desechos, el manejo de cadáveres y residuos patológicos se llevó acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 para los Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos.

## **2.5. Metodología**

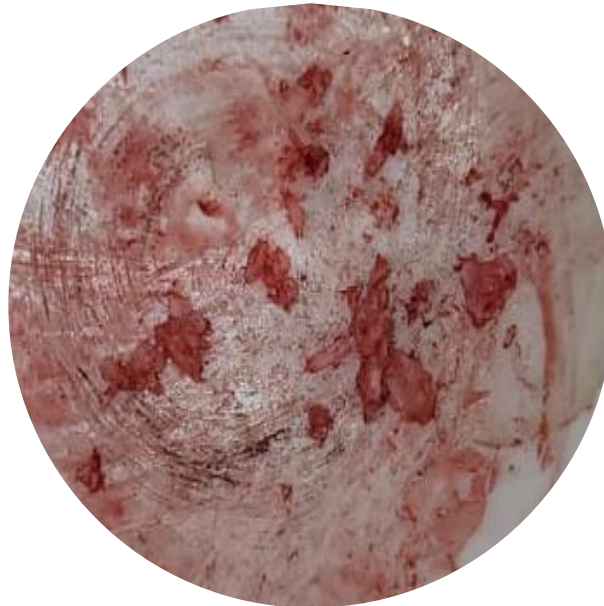
### **2.5.1. Obtención de los materiales a evaluar**

#### **2.5.1.1. Obtención del autoinjerto**

El autoinjerto se obtuvo durante la cirugía, tomando la calota del modelo animal y triturándola con ayuda de mortero y pistilo (Figuras 2 y 3).



**Figura 2. Calota.** Obtención de hueso perteneciente a la calota para su uso como autoinjerto.



**Figura 3. Calota triturada.** Trituración de tejido con técnica directa utilizando mortero y pistilo para colocar como autoinjerto.

#### **2.5.1.2. Obtención del hidrogel de matriz ósea**

El hidrogel de matriz ósea (Figura 4) fue facilitado por parte del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, elaborado con una metodología ya establecida por Ayala Ham (25).



**Figura 4. Hidrogel.** Presentación del hidrogel inyectable (bECMh) facilitado por el laboratorio de Microbiología Molecular.

## **2.5.2. Procedimiento**

### **2.5.2.1. Preparación preoperatoria**

Se esterilizaron todos los instrumentos quirúrgicos en autoclave y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (20-25°C). La mesa de trabajo fue desinfectada con etanol al 70% (34) (Figuras 5 y 6).



**Figura 5. Mesa de trabajo y material.** Condiciones óptimas de trabajo en la mesa quirúrgica.



**Figura 6. Selección de instrumental.** Porta agujas, mango de bisturí #4, elevador de periostio Prichard, sutura 000, retractor de Minnesota, pinzas de curación, espejo dental #5, porta agujas Castroviejo, elevador de periostio P20, pinzas de adson, hoja de bisturí.



Los animales fueron pesados para colocar anestesia utilizando técnica de inyección intramuscular creando un coctel de ketamina (Clorkétam, Vetoquinol), xilacina (Procin, Pisa) y agua inyectable, 1,000 µl/kg (34) (Figura 7). La profundidad de la anestesia se observó por falta de reflejo al auscultar y palpar la pata del animal (33).



**Figura 7. Infiltrado de Anestesia.** Técnica de inyección intramuscular en la extremidad inferior izquierda.

Al comprobar la profundidad de la anestesia, el animal se afeita en el extremo craneal, específicamente en el área rostral desde la bóveda nasal hasta el extremo caudal del cráneo, para después desinfectar toda la zona extendiéndose al área circundante utilizando un hisopo con alcohol al 70%, así como para eliminar los restos de pelo (34) (Figura 8).



**Figura 8. Tricotomía.** Afeitado de zona quirúrgica con rasuradora eléctrica inalámbrica.

Se desinfecta el área de afeitado y las zonas circundantes con yodo con ayuda de un hisopo, evitando aplicar la solución sobre los ojos (34). Finalmente se coloca un campo estéril sobre el cuerpo y los ojos para el aislamiento del área quirúrgica (33).

#### **2.5.2.2. Procedimiento quirúrgico**

Utilizando una hoja de bisturí 15C, se realiza una incisión de aproximadamente 1.5cm hasta el periostio sobre el cuero cabelludo desde el hueso nasal, hasta la parte caudal para observar la bóveda craneal. Se separa el periostio que cubre la bóveda craneal por la línea media sagital empujando suavemente hacia los lados con un elevador de periostio (P20, Hu-Friedy) y se utiliza un retractor para separar los tejidos blandos y exponer el hueso subyacente, el cual se irriga con solución salina estéril (Figura 9). El defecto crítico se realiza con una fresa trepanadora de 8 mm de diámetro (Hu-friedy) a 1500 rpm, irrigando la fresa y la bóveda craneal gota a gota con solución salina estéril aproximadamente 1 gota cada 2 segundos (34) (Figura 10). La velocidad y la irrigación son fundamentales para prevenir lesiones térmicas que puedan dañar el tejido en los márgenes del defecto, que puedan crear confusión en los resultados (33).



**Figura 9. Elevación de colgajo.** Bóveda craneal expuesta después de elevación de colgajo fasciocutáneo y resección de periostio.



**Figura 10. Inducción de defecto crítico.** Creación del defecto con fresa trepanadora de 8 mm de diámetro (Hu-Friedy) a 1500 rpm.

Durante la trepanación, se aplica ligera presión por todo el perímetro del defecto. Se coloca el elevador de periostio en el margen para crear movimiento alrededor de toda la circunferencia aplicando suave presión para completar el defecto y levantar suavemente liberando la duramadre desde la porción inferior del hueso (Figura 11). Una vez liberada, se realiza un movimiento de palanca para separar por completo la bóveda craneal de la duramadre y terminar de crear el defecto (34).

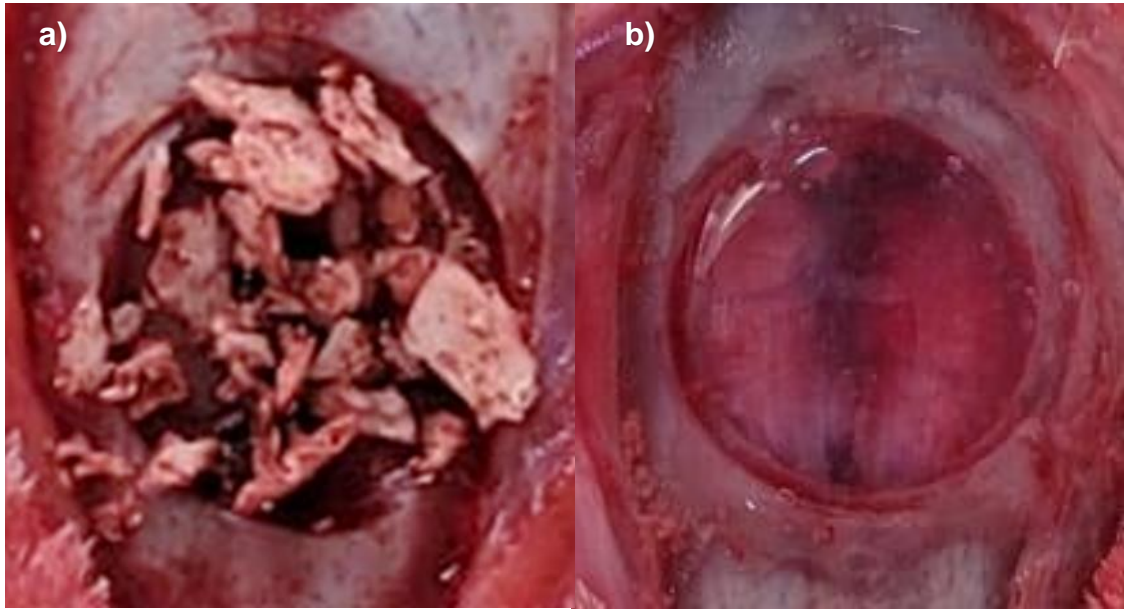
El defecto es lavado con abundante solución salina estéril para eliminar los fragmentos de hueso y colocar los materiales de investigación (34) (Figura 12).

Se cierra el periostio cubriendo el material a evaluar y se sutura la piel sobre el periostio con una sutura continua 000 de seda (34) (33) (Figura 13).





**Figura 11. Defecto óseo.** Defecto de corte regular y limpio, se observa las meninges y la vena cerebral media sin alteraciones.



**Figura 12. Colocación de materiales. a) Autoinjerto. b) bECMh.**



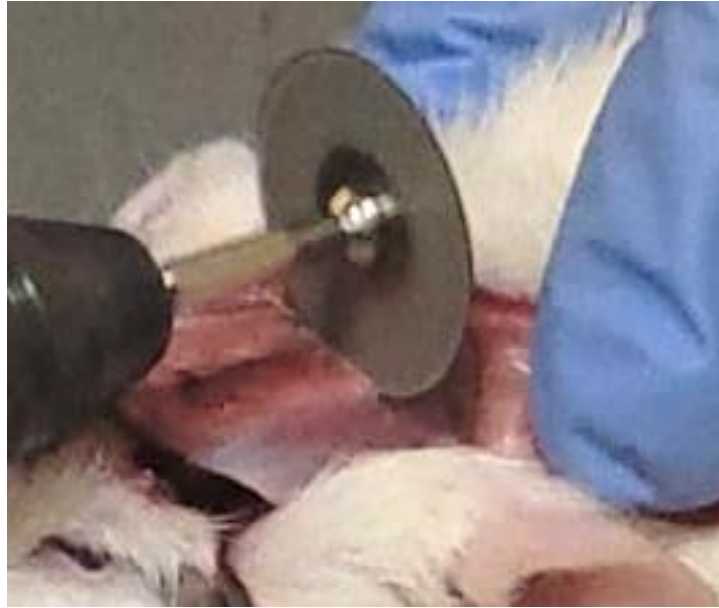
**Figura 13. Sutura.** Se realizó la técnica de punto continuo simple después de la cirugía.

### **2.5.2.3. Cuidado posoperatorio**

Una vez terminado el procedimiento quirúrgico, se limpia cuidadosamente la cabeza con solución salina para eliminar la sangre (34). Se deja en observación durante 24 horas para posteriormente, transferir a las jaulas por separado hasta su sacrificio (33).

### **2.5.2.4. Sacrificio y toma de muestra**

Cumplido el periodo de evaluación (16 semanas), se realiza la eutanasia de los modelos experimentales en una cámara de cloroformo. Se realiza el mismo procedimiento que en la cirugía para exponer el tejido en el área de la calota para realizar la toma de muestra con ayuda de un motor de baja velocidad y disco de diamante de 22 mm de diámetro (Figuras 14 y 15). Finalmente, las muestras se colocan en formalina al 10% para realizar la evaluación histológica (34).



**Figura 14. Obtención de muestra.** Para el análisis de las muestras, se obtuvieron cortando toda la bóveda craneal con disco de diamante de 20 mm a 1500 rpm.



**Figura 15. Necropsia.** Extracción de la muestra se realizó con pinzas de disección romas.

### **2.5.3. Análisis histológico**

Las muestras se colocan en formalina al 10% durante 24 horas y se realiza la descalcificación con ácido nítrico al 6% por 5 días.

Posteriormente se realiza el procesamiento de la muestra (HistoKinette) durante 12 horas en total. Se realiza la orientación, el parafinado y el corte de la muestra de 5  $\mu\text{m}$  de espesor con ayuda de un microtomo, para finalmente teñirlo con hematoxilina eosina.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. bECMh tiene capacidad para la regeneración ósea *in vivo***

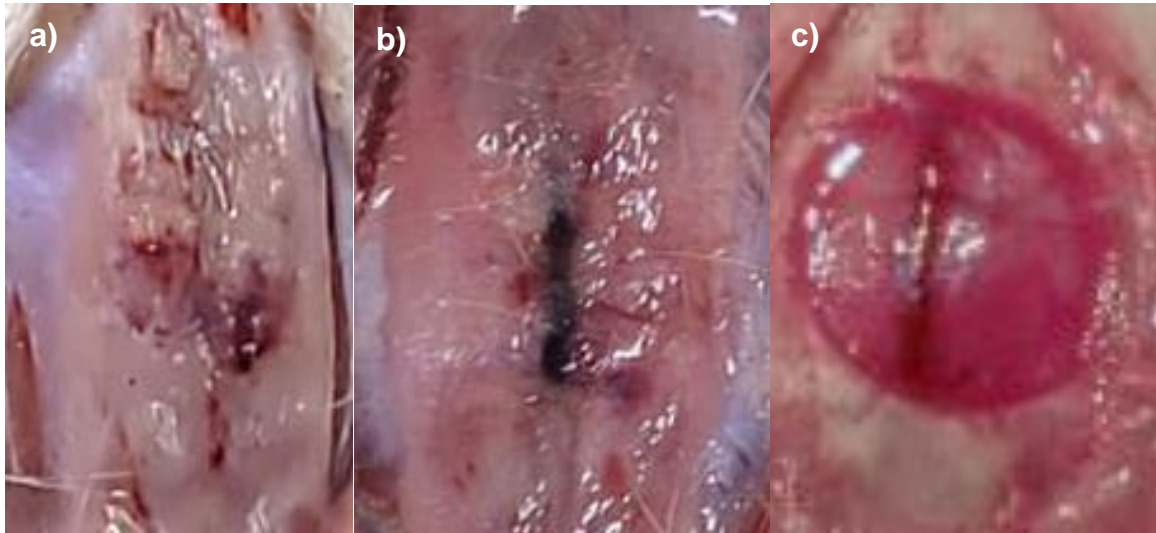
#### **3.2. Evaluación macroscópica**

En el grupo control positivo al cual se le colocó el autoinjerto, se observó formación de tejido y presencia de vasos sanguíneos, indicadores importantes de regeneración del área del defecto crítico, ya que al tacto se presentaba dureza en toda el área implantada (Figura 16a).

De igual manera, en el grupo en donde se utilizó hidrogel de matriz extracelular ósea (bECM), se observó formación de tejido y presencia de vasos sanguíneos. Sin embargo, al tacto presentaba una dureza parcial, esto pudiera deberse a la posible presencia de áreas sin mineralizar (Figura 16b).

Por otra parte, en el grupo control negativo, se observó una membrana de tejido muy delgada, la cual permitía observar la arteria media cerebral y al tacto no presentaba dureza en toda la superficie del defecto, por lo que se dedujo que no presentó áreas mineralizadas, confirmando así, que el defecto que se realizó no se puede reparar por sí solo (Figura 16c).





**Figura 16. Evaluación de injertos *in vivo*.** Fotografías al momento del sacrificio después de 4 meses de implantación. a) Hidrogel de matriz ósea (bECMh). b) Autoinjerto. c) Control negativo

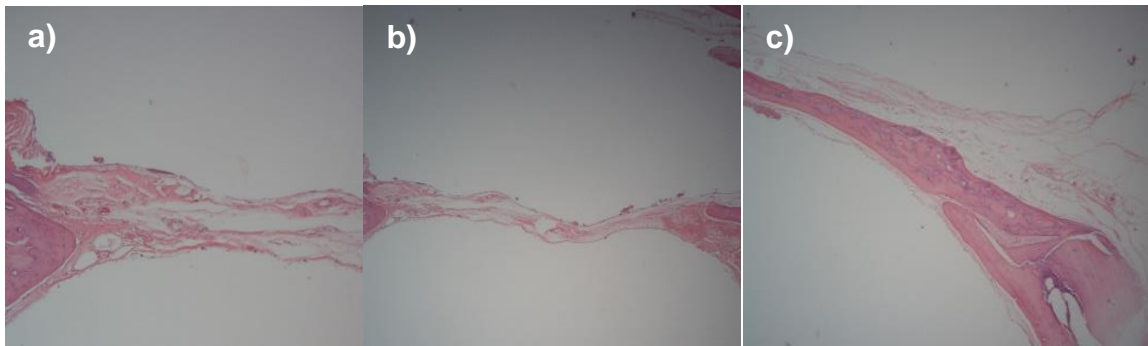
### **3.3. Evaluación histológica**

En el grupo bECMh se pudo observar gran adaptación del andamiaje en los bordes del tejido óseo nativo, se visualizó lagunas espaciales las cuales concuerdan con restos de material correspondiente al hidrogel circunscritas por células de tipo epitelioides. En la zona medial correspondiente a la sutura media frontal se observó un tejido conectivo denso y vascularizado, así como una matriz inmadura con invaginaciones celulares de apariencia osteoide. Se encontraron escasas células inflamatorias de tipo linfocitos. Estas características son consistentes de un tejido óseo vital maduro (Figura 17-19).

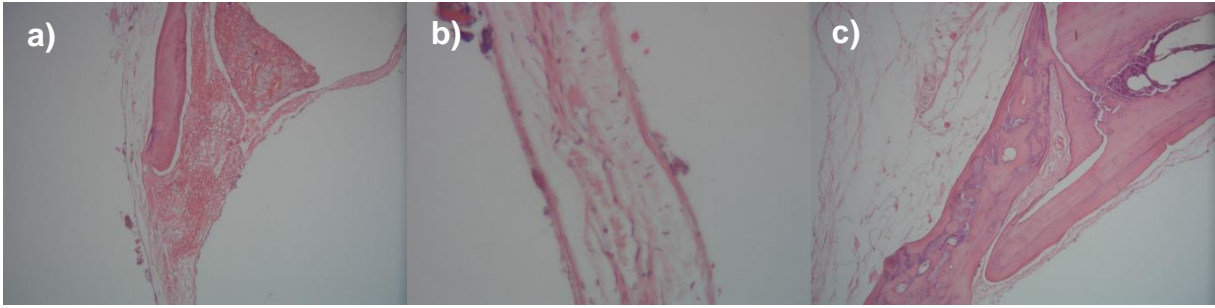
Por otro lado, el grupo autoinjerto exhibió fragmentos óseos con continuidad de tejido conectivo fibroso denso con áreas laxas, presencia de vasos sanguíneos de gran calibre y en la zona céntrica del defecto fragmentos óseos de aspecto inmaduros. Neoformación de tejido óseo rodeado de fibras de colágeno y presencia tanto de tejido óseo con vitalidad por células osteocitos existentes, así como fragmentos óseos sin vitalidad y osteoclastos en la periferia (Figura 20-22).

Finalmente, en el grupo control negativo, se observaron células fusiformes consistentes con fibroblastos, inmersas en fibras de colágeno definiéndose como tejido conectivo de reparación libre de matriz pseudo mineralizada o estructuras óseas (Figura 23).

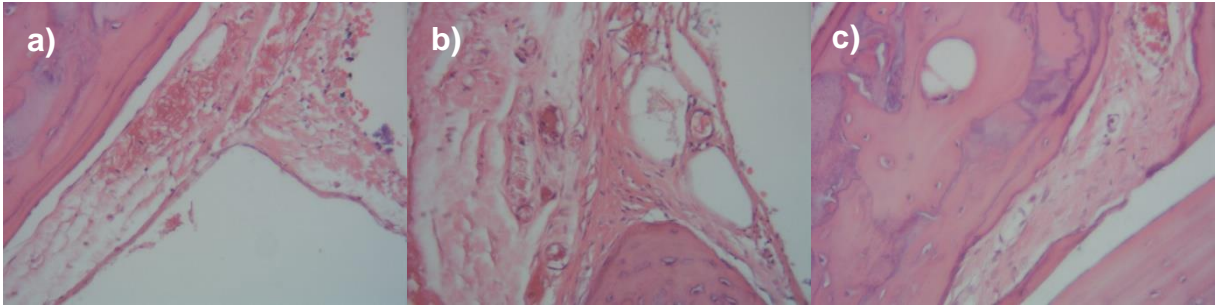
### 3.3.1. Grupo 1. bECMh



**Figura 17. Evaluación histológica 4x. bECMh.** a) Fragmento tejido óseo con tejido conectivo laxo denso. b) Bordes de lecho quirúrgico con formación de tejido conectivo. c) Tejido óseo de apariencia inmadura cubierto por capa de tejido adiposo.

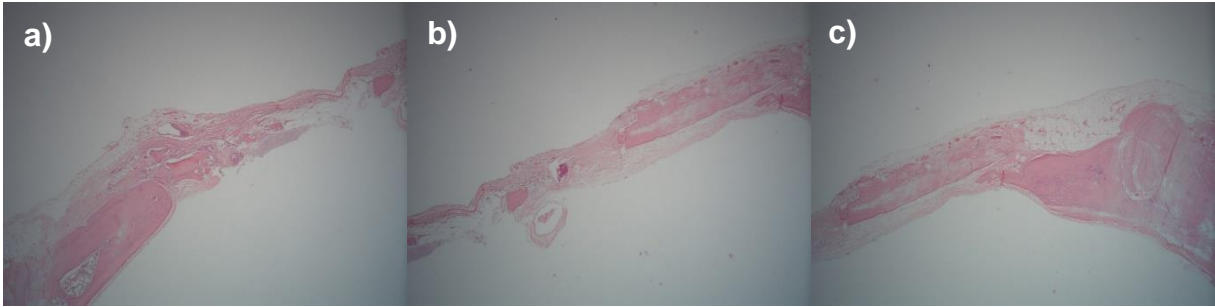


**Figura 18. Evaluación histológica 10x. bECMh.** a) Presencia de hidrogel y fragmento de tejido óseo vital con osteoide. Gran mayoría de estroma sustituido por hidrogel. b) Tejido conectivo laxo. c) Tejido óseo de lecho quirúrgico con médula ósea roja. Tejido óseo inmaduro con líneas de osteoide.

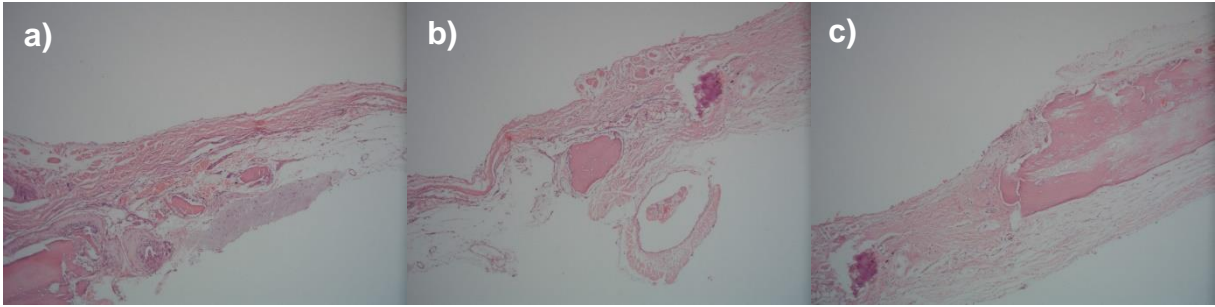


**Figura 19. Evaluación histológica 40x. bECMh.** a) Material correspondiente a hidrogel. Pequeñas bandas cortas con escasas células inflamatorias de tipo leucocitario (linfocitos). b) Tejido óseo vital maduro y tejido conectivo denso vascularizado con vasos hemocongestionados. c) Tejido óseo inmaduro con líneas de osteoide y tejido conectivo denso vascularizado.

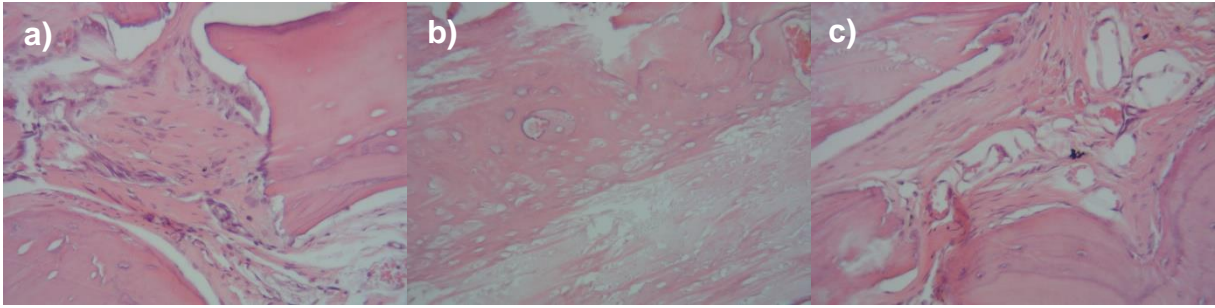
### 3.3.2. Grupo 2. Autoinjerto



**Figura 20. Evaluación histológica 4x. Autoinjerto.** a) Fragmento óseo con continuidad de tejido conectivo entremezclado con fragmentos óseos de tamaño variable. b) Tejido óseo y tejido conectivo, subyacente se observa una arteria. c) Fragmento óseo de aspecto inmaduro que migra a la zona céntrica del defecto.



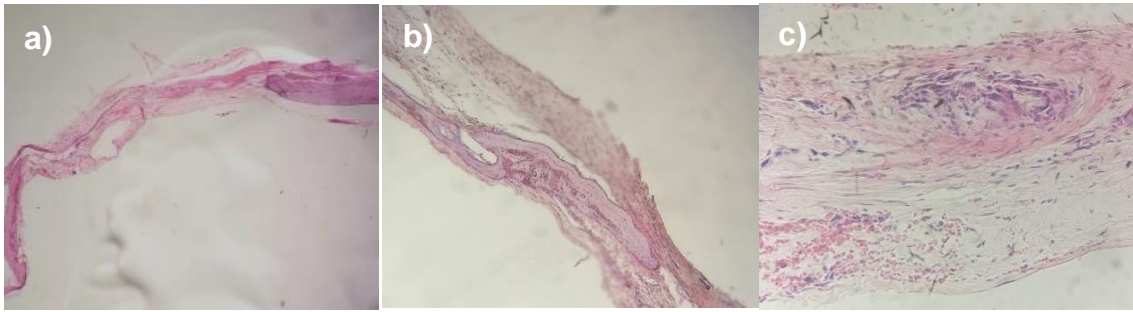
**Figura 21. Evaluación histológica 10x. Autoinjerto.** a) Tejido conectivo denso con áreas laxas, vascularizado con presencia de espículas óseas. b) Tejido conectivo, se observa espícula ósea y subyacente, vaso sanguíneo de gran calibre. c) Irregularidad de tejido óseo con vitalidad (presencia de células, osteocitos) y espículas óseas no vitales.



**Figura 22. Evaluación histológica 40x. Autoinjerto.** a) Tejido conectivo fibroso denso con zonas laxas, vascularizado y algunos vasos hemocongestionados. Fragmentos óseos sin vitalidad por ausencia de osteocitos. Presencia de osteoclastos en la periferia. b) Neoformación de tejido óseo de aspecto vital, rodeado de fibras de colágeno. c) Fragmento de tejido óseo con tejido conectivo denso vascularizado.



### 3.3.3 Grupo 3. Control negativo



**Figura 23. Evaluación histológica. Control negativo.** a) 4x Bordes de lecho quirúrgico con formación de tejido conectivo. b) 10x Tejido conectivo denso con infiltrado celular de tipo epitelioides. c) 40x Tejido conectivo fibroso laxo vascularizado, con cúmulo de células basófilas aparentemente inflamatorias.

#### 4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizó bECMh *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. En 2016 Dennis y col, desarrollaron un gel compuesto a base de matriz extracelular ósea desmineralizada, cartílago descelularizado, ácido hialurónico y nanopartículas de hidroxiapatita, realizando una evaluación *in vitro* con células mesenquimales. Teniendo como resultados que los materiales no mostraron signos de citotoxicidad y promovieron la viabilidad celular siendo una plataforma prometedora para estudios de ingeniería de tejido óseo (23).

Por otro lado, en estudios *in vivo*, realizados por Muñoz-Ruiz y col, en 2017, evaluaron histológicamente con tinción de hematoxilina y eosina (H&E), el efecto de biomateriales sobre defectos óseos de 5 mm en el fémur de conejo de nueva Zelanda a 4 y 8 semanas. Usaron un andamio a base de matriz de vejiga de la submucosa urinaria porcina (UBM) biofuncionalizado con beta-fosfato tricálcico (UBM/ $\beta$ -TCP) y su respectivo control negativo (NC). Los andamios a base de UBM o biofuncionalizado con  $\beta$ -TCP (UBM/ $\beta$ -TCP), mostraron gran capacidad para promover la neoformación ósea; sin embargo, el hidrogel de UBM sin funcionalizar produjo un tejido mejor organizado y con baja respuesta inflamatoria en comparación con el grupo de UBM/ $\beta$ -TCP. Histológicamente el grupo  $\beta$ -TCP a las 4 y 8 semanas presentó neoformación de tejido óseo y cartilaginoso, con presencia de infiltrado inflamatorio; mientras que, el grupo UBM presentó baja formación de tejido óseo y cartilaginoso, así como baja presencia de infiltrado inflamatorio, y el grupo NC presentó formación de tejido conectivo con baja formación de tejido cartilaginoso. Estos datos concuerdan con nuestros hallazgos debido al comportamiento dinámico de los hidrogeles sin funcionalizar que posiblemente conservan moléculas de señalización inductoras de osteogénesis del tejido nativo (35).

Estos datos son consistentes con los reportados por Výborný y cols, en 2019, ya que los hidrogeles que emplearon son a base de matriz extracelular derivada de cordón umbilical humano, donde demostraron que favorecen la colonización de células del huésped en el área trasplantada (36).

Aunado a lo anterior, lo reportado recientemente por Ayala y col, en 2022, en donde se evaluaron hidrogeles de distintos tipos de matrices las cuales estaban constituidas por bECMh y bECMh/HA. Los exámenes histológicos revelaron que el hidrogel bECMh, conserva una estructura fibrilar similar al tejido nativo, además, al ser implantado en la calvaria de rata, mostró reclutamiento de células similares a fibroblastos y poca presencia de células inflamatorias (25). Todos y cada uno de estos resultados concuerdan con los hallazgos obtenidos en esta investigación, por lo cual consideramos seguir realizando más análisis para dilucidar los mecanismos fisiológicos de la regeneración ósea.

## 5. CONCLUSIONES

La regeneración *in vivo* de un defecto óseo en calvaria en un modelo murino se logró con bECMh, mostrando mejores resultados que el estándar de oro (autoinjerto). Nuestro hallazgo confirma que este biomaterial tiene gran potencial para ser una solución en daños del tejido óseo causado por traumatismos o lesiones crónicas, además el análisis histológico arrojó que en el interior de este andamio existen vasos sanguíneos de diversos calibres y bajo infiltrado inflamatorio lo que induce a una regeneración tisular controlada mientras se autodegrada permitiendo su colonización y neoformación ósea.

## **6. PERSPECTIVAS**

Se sugiere que para futuros estudios se incluya el uso de tomografía computarizada cone beam (CBCT) antes de realizar la cirugía y antes de realizar el sacrificio del modelo animal, con la finalidad de obtener un panorama más preciso del proceso de formación del tejido óseo, lo cual permitiría una evaluación tridimensional del área del defecto óseo.

Comparar nuestro andamio con biomateriales comerciales.

Evaluar el comportamiento fisiológico y tisular mediante el análisis de citocinas proinflamatorias para dilucidar los posibles mecanismos de reparación ósea.

## 7. REFERENCIAS

1. Kondiah PJ, Choonara YE, Kondiah PPD, Marimuthu T, Kumar P, Du Toit LC, et al. A review of injectable polymeric hydrogel systems for application in bone tissue engineering. *Molecules*. 2016;21(11).
2. McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *DMM Dis Model Mech*. 2018;11(4).
3. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Sahu R, Dixit S, Dennis V, et al. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
4. Starch-Jensen T, Aludden H, Hallman M, Dahlin C, Christensen AE, Mordenfeld A. A systematic review and meta-analysis of long-term studies (five or more years) assessing maxillary sinus floor augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2018;47(1):103–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2017.05.001>
5. Lin H, Yin C, Mo A, Hong G. Applications of hydrogel with special physical properties in bone and cartilage regeneration. *Materials (Basel)*. 2021;14(1):1–20.
6. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory response mechanisms of the dentine–pulp complex and the periapical tissues. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1–23.
7. Apostu D, Lucaciu O, Mester A, Benea H, Oltean-Dan D, Onisor F, et al. Cannabinoids and bone regeneration. *Drug Metab Rev* [Internet]. 2019;51(1):65–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03602532.2019.1574303>
8. Rinaldo Florencio-Silva, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões PSC. Physiology of bone tissue. *Immuno-analyse Biol Spécialisée*. 2015;7(6):17–24.
9. Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during

- homeostasis and regeneration. *Nat Med*. 2014;20(8):833–46.
10. Benmassaoud MM, Gultian KA, DiCerbo M, Vega SL. Hydrogel screening approaches for bone and cartilage tissue regeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2020;1460(1):25–42.
  11. Apostu D, Lucaciu O, Lucaciu GDO, Crisan B, Crisan L, Baciut M, et al. Systemic drugs that influence titanium implant osseointegration [Internet]. Vol. 49, *Drug Metabolism Reviews*. Taylor & Francis; 2017. 92–104 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03602532.2016.1277737>
  12. Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2016;8(6):225–35.
  13. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018;180:143–62.
  14. Cho H, Bucciarelli A, Kim W, Jeong Y, Kim N, Jung J, et al. Natural Sources and Applications of Demineralized Bone Matrix in the Field of Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1249:3–14.
  15. Amirazad H, Dadashpour M, Zarghami N. Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering. *J Biol Eng*. 2022;16(1):1–18.
  16. Kwon H, Brown WE, Lee CA, Wang D, Paschos N, Hu JC, et al. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2019;15(9):550–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41584-019-0255-1>
  17. Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ. Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. 2017;2.
  18. Martine LC, Holzapfel BM, McGovern JA, Wagner F, Quent VM, Hesami P, et

- al. Engineering a humanized bone organ model in mice to study bone metastases. *Nat Protoc.* 2017;12(4):639–63.
19. Zhang K, Wang S, Zhou C, Cheng L, Gao X, Xie X, et al. Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone Res [Internet]*. 2018;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41413-018-0032-9>
  20. Hofmann S, Hilbe M, Fajardo RJ, Hagenmüller H, Nuss K, Arras M, et al. Remodeling of tissue-engineered bone structures in vivo. *Eur J Pharm Biopharm [Internet]*. 2013;85(1):119–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.02.011>
  21. Kirby GTS, White LJ, Steck R, Berner A, Bogoevski K, Qutachi O, et al. Microparticles for sustained growth factor delivery in the regeneration of critically-sized segmental tibial bone defects. *Materials (Basel)*. 2016;9(4).
  22. Lu Y, Zhang W, Wang J, Yang G, Yin S, Tang T, et al. Recent advances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration: from preparation to application. *Int J Oral Sci [Internet]*. 2019;11(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41368-019-0050-5>
  23. Dennis SC, Whitlow J, Detamore MS, Kieweg SL, Berkland CJ. Hyaluronic-Acid-Hydroxyapatite Colloidal Gels Combined with Micronized Native ECM as Potential Bone Defect Fillers. *Langmuir*. 2017;33(1):206–18.
  24. John AV, Abraham G, Alias A. Two-visit CAD/CAM milled dentures in the rehabilitation of edentulous arches: A case series. *J Indian Prosthodont Soc.* 2019;19(1):88–92.
  25. Payán RR, Josefina D, Félix L, Erika D, Silva DL, Kousuke A, et al. Evaluación de regeneración ósea empleando matriz ósea desmineralizada y en combinación con hidroxiapatita Tesis que presenta M . en C . Alfredo del Rosario Ayala Ham Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas Directores de Tesis : Dra . Elsa . 2022;



26. Zhang H, Yang L, Yang X gang, Wang F, Feng J tao, Hua K chi, et al. Demineralized Bone Matrix Carriers and their Clinical Applications: An Overview. *Orthop Surg*. 2019;11(5):725–37.
27. Holt DJ, Grainger DW. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012;64(12):1123–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.04.002>
28. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* [Internet]. 2015;6(2):105–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
29. Ayala-Ham A, López-Gutierrez J, Bermúdez M, Aguilar-Medina M, Sarmiento-Sánchez JI, López-Camarillo C, et al. Hydrogel-Based Scaffolds in Oral Tissue Engineering. *Front Mater*. 2021;8(July):1–26.
30. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci* [Internet]. 2015;28(1):57–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.3967/bes2015.006>
31. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: The relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011;45(1):14–24.
32. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012;64(12):1063–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.008>
33. Hudieb M, Haddad A, Bakeer M, Alkhazaaleh A, Alkhader M, Taani D, et al. Influence of Age on Calvarial Critical Size Defect Dimensions: A Radiographic and Histological Study. *J Craniofac Surg*. 2021;32(8):2896–900.
34. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*.

2012;7(10):1918–29.

35. Výborný K, Vallová J, Kočí Z, Kekulová K, Jiráková K, Jendelová P, et al. Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–16.
36. Muñoz-Ruíz A, Silva-Benítez E, Soto-Sainz E, Cerda-Cristerna B, Ortiz-Magdaleno M, Pozos-Guillen A, et al. Evaluation of Decellularized Matrix and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate as Biomaterials for Bone Neof ormation: In vivo Study. *Int J Morphol.* 2017;35(3):804–11.