



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LASALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
ESTOMATOLOGÍA**

TESIS

**COMPARACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA
NEOFORMACIÓN ÓSEA ENTRE AUTOINJERTO
DENTAL PARTICULADO Y PLASMA RICO EN
FACTORES DE CRECIMIENTO EN FÉMUR DE
*Oryctolagus cuniculus***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA**

Autora:

LÓPEZ MONJA MARTHA AURORA

Asesor:

CD. Mg. Esp. Vásquez Plasencia César Abraham

Línea de Investigación

INNOVACIÓN

Pimentel, octubre del 2017

**COMPARACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA
NEOFORMACIÓN ÓSEA ENTRE AUTOINJERTO
DENTAL PARTICULADO Y PLASMA RICO EN
FACTORES DE CRECIMIENTO EN FÉMUR DE
*Oryctolagus cuniculus***

Aprobación de Tesis

CD. Mg. Esp. Vásquez Plasencia César Abraham

Asesor metodólogo

CD. Mg. Roberto Carlos Ojeda Gómez

Presidente del jurado de tesis

Mg. Pérez Delgado Orlando

Secretario del jurado de tesis

CD. Mg. Carmen Rosas Honores

Vocal del jurado de tesis

DEDICATORIA

Este presente trabajo de investigación se lo dedico a Dios principalmente, a mis padres por su apoyo emocional, económico, y a todos los estudiantes o profesionales que aman y les apasiona la Odontología, especial el campo de la Periodoncia e Implantología.

AGRADECIMIENTO

Agradezco este trabajo, a Dios por haberme permitido tener fuerzas, para seguir en este laborioso trabajo de investigación y ponerme en el camino a personas que me apoyaron en la elaboración del mismo.

A mis padres por su apoyo moral y económico, que siempre estuvieron a mi lado durante todo este proceso.

A los profesionales: CD. Alberto Aguirre Aguilar por su apoyo a través de instrumentos utilizados en la ejecución y apoyo en la parte del marco teórico, al CD. Marco Reátegui Navarro por su apoyo en las cirugías realizadas, al MV. Juan Hernández, quien estuvo a cargo también de las intervenciones quirúrgicas, al equipo de EcoZoo quienes cuidaron a los modelos animales utilizados, al Mg. César Lombardi Pérez por su apoyo en las lecturas histopatológicas, al MV. Wilson Castillo Soto, quien me apoyó en brindarme información sobre el bioterio, y me dio autorización de su uso, al CD. César Vásquez Plasencia por su asesoría en la parte metodológica, al CD. Marcos Carruitero por su asesoría en la parte estadística, al CD. Imer Córdova Salinas quien fue de gran apoyo al brindarme los contactos requeridos. Muchas gracias a todo este hermoso equipo de investigación, de no ser por su apoyo este trabajo no hubiese sido posible.

ÍNDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
<i>PALABRAS CLAVE: Regeneración ósea, histopatología, autoinjerto dental particulado, plasma rico en factores de crecimiento.....</i>	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
1.1. Situación problemática:	13
1.2. Formulación del problema:	14
1.3. Justificación e importancia:.....	14
2.1.4. Objetivos:	15
Objetivo general:	15
Objetivos específicos:	15
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	15
2.1. Antecedentes de la investigación:.....	15
2.2. BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS:	27
Regeneración de tejidos orales mediante Ingeniería Tisular	48
Diferentes Alternativas de Relleno óseo:.....	51
AUTOINJERTO DENTAL PARTICULADO:	59
PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (PRGF):.....	60
ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO:	69
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:.....	72
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	74
3.1. Tipo y Diseño de la Investigación:	74
3.2. POBLACIÓN MUESTRAL:	75
3.3. HIPÓTESIS:	76
3.4. VARIABLES:.....	76
3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES:	77
3.6 Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos:	80
3.7. Procedimiento para recolección de datos:	80
3.8. Plan de Análisis estadístico de datos:	100
3.8.1. Plan de análisis:	100

3.8.2. Criterios éticos:.....	100
3.8.3. Criterios de Rigor Científico:.....	118
3.8.4. Resultados:.....	119
3.8.5. Discusión:.....	125
3.8.6. CONCLUSIONES:.....	128
3.8.7. RECOMENDACIONES:	129
IV. REFERENCIAS:.....	130
V. ANEXOS	148
ANEXO 1: Anestesia General	148
ANEXO 2: CONEJOS INSTALADOS EN EL BIOTERIO	150
ANEXO 3: ASILAMIENTO DE LOS CONEJOS UN DIA ANTES DE LA CIRUGÍA	151
ANEXO 4: PREPARACIÓN DE LOS CONEJOS ANTES DE SOMETERLOS A CIRUGÍA	152
ANEXO 5: INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA.....	154
ANEXO 6: PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO	156
ANEXO 7: AUTOINJERTO DENTAL PARTICULADO	163
ANEXO 8: MEDICAMENTOS POST-OPERATORIOS.....	167
ANEXO 9: MUESTRAS HISTOPATOLÓGICAS	168
MUESTRA HISTOPATOLÓGICA UTILIZANDO AUTOINJERTO DENTAL PARTICULADO COMO RELLENO ÓSEO SEGÚN TIEMPO (2MESES).....	168
MUESTRA HISTOPATOLÓGICA UTILIZANDO AUTOINJERTO DENTAL PARTICULADO COMO RELLENO ÓSEO SEGÚN TIEMPO (4MESES).....	169
MUESTRA HISTOPATOLÓGICA UTILIZANDO PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO COMO RELLENO ÓSEO SEGÚN TIEMPO (2MESES).....	170
MUESTRA HISTOPATOLÓGICA UTILIZANDO PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO COMO RELLENO ÓSEO SEGÚN TIEMPO (4MESES).....	171
ANEXO 10:.....	172
ANEXO 11:.....	173
SOLICITUD POR PARTE DE LA ESTUDIANTE PARA EL USO DE LAS INSTALACIONES DE LA UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO	173
ANEXO 12:.....	174
CARTA DE ACEPTACIÓN DEL USO DE LAS INSTALACIONES DE LA UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO	174
ANEXO 13:.....	175
CERTIFICADO DE INSTRUCCIÓN Y CAPACITACIÓN DEL PERSONAL A CARGO DEL CUIDADO DE LOS CONEJOS.....	175

ANEXO 14:	176
CERTIFICADO DE SUSTENTO DEL ANIMAL EN EL LABORATORIO	176
ANEXO 15:	177
CERTIFICADO DE ESTADO SANITARIO DE LOS SUJETOS DE INVESTIGACIÓN (CONEJOS)	177
ANEXO 16:	178
CERTIFICADO DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	178
ANEXO 17:	179
CERTIFICADO DEL PERSONAL ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA	179
ANEXO 18:	180
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	180

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación histopatológica de la neoformación ósea entre el autoinjerto dental particulado y el plasma rico en factores de crecimiento utilizados como relleno en fémur de conejos	119
Tabla 2: Evaluación histopatológica de la neoformación ósea del autoinjerto dental particulado según tiempo	121
Tabla 3: Evaluación histopatológica de la neoformación ósea del plasma rico en factores de crecimiento según tiempo	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fases del Remodelado óseo.....	32
Figura 2 Obtención de muestras.....	90
Figura 3 Fijación de muestras.....	90
Figura 4 Deshidratación.....	91
Figura 5 Inclusión.....	93
Figura 6 Procesador Automático.....	94
Figura 7 Confección del taco.....	95
Figura 8 Micrótopo Rotativo.....	95
Figura 9 Técnica de Extensión.....	96
Figura 10 Tipos de coloraciones.....	98
Figura 11 Dispensador de alimentos de conejos.....	113

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Comparación histopatológica de la neoformación ósea entre el autoinjerto dental particulado y el plasma rico en factores de crecimiento utilizados como relleno en fémur de conejos.....	120
Gráfico 2: Evaluación histopatológica de la neoformación ósea del autoinjerto dental particulado según tiempo.....	122
Gráfico 3: Evaluación histopatológica de la neoformación ósea del plasma rico en factores de crecimiento según tiempo.....	124

RESUMEN

El propósito de este estudio fue comparar histopatológicamente la neoformación ósea de los defectos óseos tratados con autoinjerto dental particulado y plasma rico en factores de crecimiento utilizados como relleno óseo en fémur de conejos.

Se utilizaron 24 conejos machos de la raza New Zeland de 4 - 6 meses de edad, de 2.5–3 Kg de peso divididos en dos grupos de experimentación, un grupo con defecto con dentina autoinjerto dental particulado y un defecto sin injerto; otro grupo con defecto con plasma rico en factores de crecimiento y un defecto sin injerto, se realizó el análisis histopatológico a los 2 y 4 meses respectivamente para evaluar el potencial regenerativo de ambos materiales.

En la neoformación ósea de tres cruces (Más de 60 osteocitos por campo), a los 2 y 4 meses, el autoinjerto dental particulado supera numéricamente al Plasma rico en Factores de crecimiento, particularmente a los 4 meses. Sin embargo, esta diferencia numérica no se expresa en una diferencia estadística $p > 0.05$ ($p = 0.2$ y 0.08 , a los 2 y 4 meses respectivamente).

Este estudio demuestra que el autoinjerto dental particulado posee propiedades mayores al plasma rico en factores de crecimiento en la neoformación ósea. Esta evidencia sirve para sugerir el uso del autoinjerto dental particulado como biomaterial en procedimientos de regeneración.

PALABRAS CLAVE: *Regeneración ósea, histopatología, autoinjerto dental particulado, plasma rico en factores de crecimiento.*

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare histopathologically the new bone formation of bone defects treated with particulate dental autograft and plasma rich in growth factors used as bone filling in rabbits femur.

Twenty-four male New Zealand rabbits, 4-6 months old, weighing 2.5-3 kg, divided into two experimental groups, one group with defect with particulate dental autograft and one defect without graft were used; Another group with defect with plasma rich in growth factors and a defect without graft, the histopathological analysis was carried out at 2 and 4 months respectively to evaluate the regenerative potential of both materials.

In bone neoformation of three crosses, at 2 and 4 months, particulate dental autograft numerically surpasses Plasma rich in growth factors, particularly at 4 months. However, this numerical difference is not expressed in a statistical difference $p > 0.05$ ($p = 0.2$ and 0.08 , at 2 and 4 months respectively).

This study demonstrates that particulate autograft has greater properties to the plasma rich in growth factors in the new bone formation. This evidence serves to suggest the use of particulate dental autograft as biomaterial in regeneration procedures.

KEY WORDS: Bone regeneration, histopathology, particulate dental autograft, plasma rich in growth factors.

INTRODUCCIÓN

Las terapias periodontales regenerativas buscan eliminar estos defectos periodontales mediante la regeneración de las estructuras perdidas: hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal. La meta de la terapia periodontal consiste en proporcionar al paciente una dentición que funcione en salud y confort a lo largo de su vida¹.

Los principios en los que se basa dichas técnicas de regeneración tisular son los desarrollados a partir de la década de los 80, y su actual evolución con la inclusión del plasma rico en factores de crecimiento, así como en los nuevos materiales de injerto a base de hidroxiapatita, materiales reabsorbibles y la aparición de técnicas de barrera cada vez más eficaces, han hecho que sea la técnica de elección y de máxima aplicación en la mayor parte de los casos en los que hay que aplicar regeneración ósea².

En la práctica odontológica, existen numerosos procedimientos médico-quirúrgicos, cuyo resultado es la pérdida de tejido óseo (legrados post-exodoncia, cirugía protésica, tratamiento de lesiones osteolíticas, tratamiento de tumores, etc.), que provocan lesiones cavitarias óseas extensas, por la pérdida del hueso resecaado. Estas cavidades pueden ocasionar complicaciones, tales como aparición de fracturas patológicas, osteoporosis, reactivaciones de infecciones y dificultad para la restauración protética, entre otros procesos. Para evitar estas complicaciones se recurre a la colocación de injertos óseos. La utilización del autoinjerto tiene las limitaciones propias del paciente, no siendo suficiente para rellenar cavidades

extensas. Por otra parte, la utilización del aloinjerto está ciertamente desacreditada, debida al alto índice de reacciones de hipersensibilidad que se pueden producir. Estos hechos han favorecido, que en la actualidad se utilicen técnicas de regeneración e inducción ósea, utilizándose tanto biomateriales, como materiales inorgánicos similares a la matriz ósea, especialmente hidroxiapatita^{1,2}.

Por otro lado, la pérdida ósea consecutiva al edentulismo ocasiona una reducción del soporte, que dificulta o incluso imposibilita la rehabilitación mediante prótesis dentarias removibles. La extracción dentaria genera una respuesta reparadora, caracterizada por una reabsorción ósea en la superficie alveolar y un depósito de nuevo tejido en los alvéolos vacíos. La magnitud de la reabsorción ósea progresiva del reborde alveolar residual depende de la interacción de múltiples factores: anatómicos, sexuales, biológicos, mecánicos y quirúrgicos, entre otros.

Hoy sabemos que el proceso de regeneración tisular tiene tres fases: la inflamatoria, la proliferativa y la de remodelado.

Todas ellas constituyen un continuo en el que juega un papel muy importante un gran número de factores celulares y humorales. Las plaquetas y los factores liberados por ellas (GFs) parecen determinantes en este proceso². En el presente trabajo se revisan algunos conceptos sobre los factores de crecimiento y se analiza su uso como inductores de la regeneración ósea.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Situación problemática:

La medicina regenerativa es un campo interdisciplinario emergente que busca reparar, reemplazar y regenerar células, tejidos y órganos, que viene despertando el interés médico actual en sus diversas áreas. La regeneración ósea es una técnica de estimulación para la formación de nuevo hueso utilizada en distintas áreas de la medicina entre ellas la estomatología, que tiene entre las especialidades de periodoncia, cirugía maxilofacial e implantología un inmenso campo de aplicación de esta técnica regenerativa que se encuentra en constante desarrollo en el Perú. Desde hace décadas se han desarrollado diversos sustitutos óseos para regenerar el tejido óseo perdido por traumatismos, por problemas oncológicos, por defectos congénitos o por pérdida de piezas dentales y en la actualidad aún se siguen investigando nuevas fuentes de materiales biocompatibles que puedan ser usados para regenerar hueso y que además tengan características semejantes al injerto óseo autólogo y su potencial regenerativo¹.

La preocupación de los periodoncistas e implantólogos está centrada en emplear estrategias terapéuticas para regenerar el hueso alveolar perdido con el objetivo posterior de la instalación de implantes dentales, donde deben tener en cuenta los principios de remodelación ósea. El hueso sano conserva siempre su capacidad de regeneración. Sin embargo, existen pérdidas de hueso por procesos traumáticos o infecciosos, que requieren tratamiento de regeneración. La secuencia de eventos que siguen a la cicatrización ósea es similar a los de la regeneración como la respuesta

inmediata, formación de hueso y remodelación. Las técnicas regeneración ósea es recomendada cuando se han producido dehiscencias o pérdida de alguna pared ósea durante la extracción que pudiera comprometer la inserción del implante. La regeneración ósea guiada (ROG) se basa en la formación de nuevo hueso para el relleno de defectos óseos; comprende el uso de membranas con función de barrera aptas para evitar la infiltración en la zona de reparación.

El autoinjerto dentario particulado está conformado por esmalte, dentina y pulpa que contienen matriz orgánica e inorgánica que presenta gran similitud con la matriz ósea, por lo que está siendo estudiado en animales obteniéndose resultados positivos en la regeneración ósea^{1,3}.

1.2. Formulación del problema:

¿Cuál es la diferencia histopatológica en la neoformación ósea entre autoinjerto dental particulado y el plasma rico en factores de crecimiento utilizados en fémur de *Oryctolagus cuniculus*?

1.3. Justificación e importancia:

Esta investigación inédita, tuvo como propósito comparar el potencial regenerador que tienen los injertos mencionados. Así mismo el tiempo en que se genera nuevo hueso maduro, igual al hueso original.

El estudio tiene una importancia clínica, debido a que tanto el uso del autoinjerto dentario particulado como del plasma rico en plaquetas utilizados como relleno óseo tendría una amplia aplicación en las áreas de

periodoncia, cirugía maxilofacial e implantología, y otras áreas médicas. Por otro lado, los costos de producción de ambos biomateriales, no son elevados en comparación al costo de los biomateriales comerciales, lo cual indica la viabilidad de producir un autoinjerto dentario particulado o una terapia con plasma rico en plaquetas para la solución óptima de los problemas a nivel del tejido óseo en pacientes que lo requieran.

2.1.4. Objetivos:

Objetivo general:

Comparar histopatológicamente la neoformación ósea entre el autoinjerto dental particulado y el plasma rico en factores de crecimiento utilizados como relleno en fémur de *Oryctolagus cuniculus*.

Objetivos específicos:

1. Evaluar histopatológicamente la neoformación ósea del autoinjerto dentario particulado, según tiempo.
2. Evaluar histopatológicamente la neoformación ósea del plasma rico en factores de crecimiento, según tiempo.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación:

Gomes. et al.¹ (2001), realizaron una evaluación histológica con el objetivo de demostrar la propiedad osteoinductiva de la matriz de dentina autógena

desmineralizada (MDAD) en defectos óseos en conejos incorporando la membrana amniótica humana (MAH) para la regeneración ósea guiada. Para esto se utilizaron 36 conejos adultos de 3.5 Kg divididos en dos grupos, experimental (MDAD) y control (MAH). Los resultados fueron que del grupo de los 36 conejos, 34 tuvieron éxito logrando alcanzar a formar hueso maduro a los 4 meses, mientras que 2 conejos no tuvieron el mismo éxito, podemos decir que es debido a una mala manipulación del injerto al momento de ser colocado en el defecto. La conclusión del estudio fue que la membrana amniótica humana no interfirió con los procesos de reparación y reabsorción ósea en la cicatrización de los defectos parietales en el conejo mientras que la matriz de dentina autógena desmineralizada estimuló la formación de nuevo hueso y fue incorporada completamente dentro del nuevo hueso formado. ¹

Gomes. et al.² (2002), Realizaron un estudio histológico e histopatológico con el objetivo de ver su acción de la matriz de dentina autógena desmineralizada (MDAD) y su aplicación en ingeniería tisular evaluando las propiedades osteoconductoras en defectos óseos sobre el hueso parietal y aplicando la regeneración ósea guiada con membrana de politetrafluoretileno (PTFE), para lo cual utilizaron 24 conejos adultos de 3.5 Kg de peso divididos en un grupo experimental (MDAD + PTFE) y un grupo control (solo PTFE). La MDAD se obtiene de la extracción de los incisivos centrales, y se coloca sobre defectos creados en el conejo, los resultados fueron los esperados: El grupo 1 (MDAD+PTFE) obtuvo una mayor regeneración en un menor tiempo, mientras que el grupo 2 (PTFE) obtuvo una regeneración muy pobre y necesitó de un mayor tiempo. De esta manera

se pudo concluir que la MDAD demostró propiedades osteoconductoras y fue incorporado en su totalidad en el nuevo hueso formado. ²

Fernández, R. et al.³(2005): Realizaron un estudio cuyo objetivo del trabajo fue utilizar plasma autólogo rico en factores de crecimiento (PRGF) para mejorar la respuesta quirúrgica, estimulando los mecanismos de reparación, mediante la técnica de regeneración ósea y tisular, desarrollada por Biotechnology Institute, SL. Este es un sistema para la obtención de proteínas, a partir de la propia sangre del paciente momentos antes de su utilización.

Se presenta un caso de odontoma compuesto compositum de 3 x 4 cm de diámetro mayor en el proceso alveolar anterior del maxilar y la retención del órgano dentario central superior izquierdo, los cuales fueron enucleados. En el sitio del defecto quirúrgico, se colocó plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), con material de injerto de hidroxiapatita reabsorbible, observando un mejor manejo del mismo, así como menor tiempo en la cicatrización de la herida³. Los resultados fueron exitosos el paciente tuvo una regeneración más rápida, se tomó una radiografía a los 2 meses y el hueso estaba totalmente formado. De esta manera podemos concluir que el PRGF es un buen material con muy buenas propiedades osteoconductoras y osteoinductivas.

Vásquez L. et al. ⁴(2007): Realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar la efectividad del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), en la regeneración del tejido óseo en alveolos dentarios de 20 pacientes adultos de la clínica de Periodoncia de la UAT con enfermedad periodontal avanzada

(EP) y con indicación clínica de extracción dentaria siendo seleccionados por razones protésicos.

Obteniendo tejido del alveolo dentario, material neoformado y el envío de dicha muestra a un estudio histopatológico. Los resultados obtenidos muestran que en 19 pacientes reportaron tejido óseo maduro y en el grupo de hueso humano liofilizado un paciente reportó tejido fibroso maduro con hueso neoformado. Los cambios radiográficos se apreciaron en ambos grupos, solo un paciente del grupo PRGF no se apreciaron cambios significativos.

En el grupo de PRGF, la histopatología evidenció la formación de tejido óseo con cierto grado de maduración, trabéculas óseas con osteocitos en su interior y ribetes de osteoblastos, y en el lado contralateral donde se aplicó HLCA, clínicamente el alveolo estaba parcialmente relleno e histológicamente se encontró la presencia de tejido conectivo denso con alguna trabécula ósea en su interior⁴. Se concluye que el uso del PRGF para defectos óseos es muy bueno ya que aparte de ser un aloinjerto tienen un buen potencial regenerador.

Casteulani A. et al ⁵ (2007): Realizaron un estudio donde el objetivo era el de evaluar los resultados de un tratamiento combinado mediante osteosíntesis y aplicación de injerto enriquecido con agregado plaquetario, con resultados alentadores. Para ello utilizaron una serie, que comprendió 29 pacientes tratados entre 1999 y 2006, laboralmente activos, con una edad promedio de 42 años (rango, 26 a 62 años). En todos los casos se efectuó osteosíntesis con el agregado plaquetario rico en factores de crecimiento plaquetario.

Los resultados se analizaron en función de la formación de callo fracturario a los 6 meses. La obtención de injerto esponjoso fue dificultosa en los pacientes reintervenidos. La obtención y preparación del agregado plaquetario no presentó inconvenientes. La consolidación clínica y radiológica se alcanzó en los 29 casos al término de 4 meses (2-6 meses); en 2 casos fue necesario repetir el procedimiento de aporte sin recambio del implante a los 2 meses de la primera intervención. Llegaron a la conclusión que el injerto autólogo enriquecido con plasma rico en factores de crecimiento pudo haber contribuido de manera favorable a la consolidación de estos casos complejos, con gran ausencia biológica, en los que habían fracasado otros métodos⁵.

Andersson L. et al.⁶(2009), realizaron estudios sobre injertos de dentina en defectos óseos en tibia y mandíbula en conejos para demostrar las propiedades osteoinductivas de la dentina. Se utilizaron 8 conejos de raza Nueva Zelanda para preparar defectos óseos a nivel del ángulo mandibular y en la tibia. Se utilizó la dentina de premolares humanos extraídos por motivos ortodónticos, se formaron bloques de dentina y se rellenaron en seis de ocho defectos tibiales y seis de ocho defectos mandibulares, dos defectos tibiales y dos defectos mandibulares fueron el grupo control. El sacrificio de los conejos fue a los tres meses para la evaluación radiográfica e histológica. Los resultados fueron que los 8 conejos utilizados en este estudio alcanzaron a formar hueso maduro y similar al original. Los estudios concluyeron en que el injerto de dentina puede incorporarse al hueso sin inflamación y puede ser utilizado como inductor óseo para ser reemplazado después por hueso⁶.

Barragán K. et al ⁷(2011): Realizaron un estudio donde el objetivo era el de demostrar que el uso de plasma rico en factores de crecimiento disminuye la recurrencia de fístulas nasopalatinas. Lo realizaron entre abril de 2008 y junio de 2009 se realizó un estudio experimental, prospectivo y de cohorte con siete pacientes con 10 fístulas nasopalatinas, las cuales se cerraron por medio de colgajos mucoperiosticos locales e injertos óseos autólogos mezclados con plasma rico en factores de crecimiento. Se dio seguimiento de 6 a 12 meses y se demostró que 90% de las fístulas cerraron completamente ($p = 0.14$); este índice de recurrencia fue menor al reportado por otros autores. Posteriormente, las variables de los cierres se estudiaron y compararon y ninguna resultó estadísticamente significativa. Los resultados fueron que los 7 pacientes lograron disminuir las 10 fístulas presentes que tenían cada uno y la posterior regeneración de hueso en dicho lugar utilizando el hueso autólogo con PRGF. A través de este estudio se pudo concluir que el uso de plasma rico en factores de crecimiento durante el cierre de fístulas nasopalatinas es eficaz, seguro y de bajo costo para el paciente⁷.

Fierro V, et al ⁸ (2011): Realizaron un estudio, donde el objetivo era la importancia del uso de plasma rico en plaquetas y plasma rico en factores de crecimiento en la cirugía bucal y maxilofacial.

Se reporta un caso de paciente femenino de 21 años de edad, con dolor moderado en zona de tercer molar inferior izquierdo y derecho.

Se realiza remoción quirúrgica de ambos terceros molares inferiores. Se extraen 20 cc. de sangre del paciente para obtener plasma rico en factores

de crecimiento el cual fue colocado en zona de extracción de tercer molar inferior izquierdo. En zona de tercer molar inferior derecho se irrigó con suero fisiológico. Al tercer día postoperatorio se observa clínicamente menor inflamación extraoral del lado izquierdo comparado con lado derecho. Intraoralmente menor inflamación y eritema de la zona y mejor epitelización del lado izquierdo en relación con lado derecho. Al quinto día postoperatorio se retira sutura en ambos lados, observando mejor epitelización y menos eritema de la herida en lado izquierdo. Al séptimo día es clara la diferencia en la regeneración de tejidos blandos en el lado izquierdo comparado con el derecho. Se refería menos dolor del lado izquierdo en cada una de sus citas control. La experiencia en el presente caso nos hace sugerir que el uso de plasma rico en factores de crecimiento puede beneficiar el postoperatorio de los pacientes después de la remoción quirúrgica de terceros molares inferiores⁸.

Guerrero AF. et al ⁹ (2011): Realizan un estudio cuyo objetivo fue el de evaluar la eficacia regenerativa periodontal del PRFC en combinación con biomateriales óseos en el tratamiento defectos intraóseos periodontales. Se presenta un estudio de tipo experimental, analítico, longitudinal, prospectivo y abierto. El cual se realizó en el Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, seleccionándose 16 defectos intraóseos, donde se realizaron curetajes abiertos con colocación de biomaterial según el grupo asignado, cada uno de ellos con cuatro defectos: Grupo A, colocación de PRFC, Grupo B, injerto aloinjerto y PRFC, Grupo C, aloplástico y Grupo D, aloplástico y PRFC. Se realizó el protocolo de obtención de la fracción es del plasma.

Se realizan valoraciones radiográficas postquirúrgica inmediata, a los 7, 15 y 60 días. Así como, la toma de biopsia a los 60 días y a los 12 meses para estudio histológico. En relación a la evaluación clínica, radiográfica e histológica, los hallazgos postoperatorios indican que existe una estimulación en todos los grupos de regeneración ósea, presentándose las condiciones idóneas para la regeneración periodontal. Los resultados fueron que no hubo diferencia significativa entre el grupo A, B y C, pero ellos comparados con el grupo D si tuvieron gran diferencia ya el que grupo D (aloinjerto+PRGF) tuvo un mayor índice de regeneración ósea, llegando a formar hueso maduro. Así se da la conclusión que la combinación de las técnicas regenerativas PRFC y biomateriales óseos ofrecen una alternativa para obtener tejidos de calidad idóneos. La evolución postoperatoria clínica, radiográfica e histológica fue satisfactoria en todos los grupos y esta última evidencia que dicha combinación es una alternativa de tratamiento quirúrgico que tiene por objetivo lograr una regeneración tanto ósea como periodontal⁹.

Sung-Min Park et al.¹⁰(2012), realizaron un estudio de Aplicación clínica de autoinjerto dentario particulado como material de injerto óseo. Es un sistema que trata a los pacientes mediante la fabricación de material de injerto óseo de sus propios dientes extraídos. En primer lugar, se ha introducido por el diente de Corea del Banco Centro de I + D, y ha cumplido con muchos médicos y pacientes para su osteoconducción, así como la capacidad de osteoinducción.

El autoinjerto dental es un material de injerto óseo consiste en 55 % inorgánica y 45 % sustancia orgánica. Entre las sustancias inorgánicas,

hidroxiapatita (HA) tiene las características de la combinación y la disociación de calcio y fosfato como las del hueso. Las sustancias orgánicas incluyen la proteína morfogenética ósea (BMP) y las proteínas con la capacidad de osteoinducción así como de colágeno tipo I, que es el mismo que el hueso alveolar en sí. Por lo tanto, tienen la misma capacidad de remodelado óseo con hueso autógeno

El autoinjerto dentario es uno de los materiales de injerto óseo se dividen en tipos de bloques y en polvo. El tipo de bloque tiene osteoinducción, la capacidad a través de la sangre de humectabilidad y capacidad osteoconducción mediante el espacio y rastrero sustitución y mantenimiento de espacio habilidades; que es remodelado por el espacio durante un período específico. El tipo de polvo se suministra en base a varios tamaños de partículas, porosidad entre polvos y humectabilidad sangre, osteoconducción, osteoinducción y reptiles capacidades de sustitución.

Realizaron la colocación del implante en combinación con la regeneración osteoinductiva preservando el alveolo después de la extracción dental, elevación de seno maxilar y aumento de la cresta utilizando injertos en bloque, en polvo y en bloque + polvo para 250 pacientes con defecto óseo alveolar y que visitaron al Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial de la Facultad de Odontología de la Universidad de Dankook desde septiembre del 2009 hasta agosto del 2011.

La estabilización inicial promedio de los implantes colocados fue del 74 cociente de estabilidad del implante (ISQ), y la estabilización secundaria promedio fue de 83 ISQ. Por complicaciones después de la cirugía, dehiscencia de la herida se desarrolló en 10 casos. Entre ellos, 7 casos no

tenían pérdida de la cresta ósea con un buen tratamiento secundario, y 3 casos tuvieron pérdida ósea crestal promedio de 2 mm. En 9 casos, hematoma desarrolló después de la cirugía, pero fue tratado sin ningún problema grave.

En 2 casos, la osteointegración fracasó; Se retiraron los implantes, y los nuevos se colocaron de nuevo inmediatamente. El período medio de examen tras la finalización de la dentadura fue de 9 meses, que van desde 4 a 12 meses. Todos los casos mantienen las funciones normales.

A la evaluación histológica se observó la formación de nuevo hueso. Con los datos anteriores, diente auto material de injerto óseo es muy útil en situaciones clínicas porque es compatible con la regeneración ósea excelente a través de la osteoinducción y la capacidad de osteoconducción y minimiza la reacción de cuerpo extraño debido a la homogeneidad genética¹⁰.

Han-Tsung Liao, MD, PhD et al.¹¹ (2014), realizaron un estudio de aplicación de plasma rico en plaquetas y fibrina rica en plaquetas en el injerto de grasa, donde encontraron que debido a las propiedades naturales de la grasa, el injerto de grasa sigue siendo un procedimiento popular para la reconstrucción y aumento de volumen de tejido blando. Sin embargo, el resultado clínico es variable y depende de la técnica de obtención del plasma rico en plaquetas (PRP), ya que éste contiene unos gránulos que poseen varios factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular y factor de crecimiento epidérmico los cuales son liberados después de su activación.

Se encontró que existen diferentes métodos de preparación y activación de PRP y concentraciones de factores de crecimiento. Además, se discuten los posibles mecanismos para el papel de PRP en el injerto de grasa mediante la revisión de los estudios in vitro con células madre derivadas de tejido adiposo, preadipocitos y adipocitos y la investigación preclínica y clínica. También revisaron a la fibrina rica en plaquetas, denominado como una segunda generación de PRP, y su biología de liberación lenta y los efectos sobre los injertos de grasa en comparación con el PRP tanto en investigación animal y clínica. Por último, proporcionaron una base general sobre la cual evaluaron críticamente los estudios anteriores, discutieron las limitaciones de la investigación anterior y los planes para futuros experimentos para mejorar los resultados óptimos del PRP en el injerto de grasa¹¹.

Ítalo de Macedo Bernardino¹² (2014), realizó un estudio cuyo objetivo fue identificar los tipos de animales utilizados comúnmente en la investigación experimental en odontología en Brasil. Para ello, evaluaron 2721 estudios, de los cuales 379 (13,9%) involucraban a animales. Las variables analizadas fueron: área de conocimiento, tipo de estudio, tipo de animal, número de animales, sacrificio, parte del cuerpo utilizado y financiación. Los análisis estadísticos descriptivos e inferenciales se realizaron mediante la prueba de chi-cuadrado con el software SPSS 18.0. Se encontró que los estudios en donde se utilizaban más animales según su área de conocimiento eran: Investigación en Materiales Dentales (38,8%) y Cirugía, Anestesiología dental e implantología (25,6%). La mayoría de los estudios

fueron in vivo (60,2%), utilizando ratas (82,7%) y la media fue de 44,3 animales. La mayoría de los animales fueron sacrificados durante o al final del experimento (61,8%) y la parte del cuerpo más utilizada fueron los dientes (44,2%). Se concluyó que las áreas de Materiales Dentales y Cirugía, Anestesiología e implantología son aquellas en donde los animales son más utilizados, con predominio de los roedores, y que por lo general se sacrificaban durante o al final del experimento.

El uso de animales ha planteado y sigue planteando muchas discusiones en los ámbitos epistemológicos, sociales, económicos y religiosos. Sin embargo, teniendo en cuenta los animales como socios de la humanidad, en lugar de víctimas, puede ser el primer paso en el camino hacia una coexistencia pacífica de las diferentes corrientes de pensamiento que impregnan el mundo.

Por último, los profesores, graduados y estudiantes que participan en la investigación biomédica deben conocer y practicar los principios éticos de protección de los animales de acuerdo con los principios internacionales que rigen la experimentación con animales¹².

Tae-Hoon Kim et al.¹³ (2014), realizaron un estudio de Comparación de plasma rico en plaquetas (PRP), fibrina rica en plaquetas (PRF) y el concentrado de factores crecimiento (CGF) en el cráneo de conejos para la curación de defectos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del plasma rico en plaquetas (PRP), fibrina rica en plaquetas (PRF) y el concentrado de factores de crecimiento (CGF) en la cicatrización ósea.

Doce conejos fueron incluidos en este estudio aleatorio, ciego, prospectivo; defectos de 10 mm de tamaño fueron creados en el hueso parietal, relleno de PRP, PRF, CGF y sin relleno. El volumen de la densidad mineral ósea y el hueso se analizaron con la tomografía computarizada microscópica (micro-CT) y un estudio histomorfométrico a la 6ª y 12ª semana. Encontraron al análisis de micro-CT que la densidad mineral ósea y el volumen óseo fueron mayores en el grupo experimental que en los controles, tanto en a la 6 y 12 semana, pero no entre los grupos experimentales. Del mismo modo, el examen histomorfométrico reveló que hubo más formación de hueso en el grupo experimental. Concluyeron que la adición de PRP, PRF y CGF había aumentado significativamente la formación de hueso a la 6ª semana. El efecto del PRP, PRF y CGF era similar y puede ser útil en el futuro para aumentar la tasa de éxito de los injertos óseos¹³.

2.2. BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS:

Uno de los objetivos de la periodoncia es que la dentición funcione en salud y confort a lo largo de la vida del paciente, la terapia periodontal incluye dentro de sus indicaciones revertir los defectos anatómicos persistentes resultantes de la periodontitis activa entre ellas la pérdida ósea alveolar ¹⁰, utilizando biomateriales y métodos de regeneración. En cirugía maxilofacial la regeneración ósea es aplicada en las reconstrucciones de rebordes alveolares, así mismo en los grandes defectos provocados por la extracción de tumores y quistes ^{11,12,13} con el fin de mejorar las condiciones del tramo óseo comprometido. A partir de los estudios de Bränemark que condujeron

al desarrollo y aceptación universal de los implantes dentales, la implantología oral busca mejorar las condiciones óseas alrededor del implante dental, utilizando técnicas como la elevación de piso de seno maxilar, recubrimiento de fenestraciones y dehiscencias óseas alrededor del implante, entre otros. En general tanto la medicina como la estomatología vienen investigando nuevos biomateriales que sustituyan al tejido óseo perdido. ^{13, 14}

Proceso de Regeneración:

La comprensión de las fases de regeneración tisular en el modelo cicatricial es esencial para entender los mecanismos de reparación ósea y de los beneficios que puedan tener los biomateriales utilizados en este proceso. ^{18, 19, 20} Aunque no se conoce de forma concreta la cascada de remodelación ósea, se sabe que está muy relacionada con el control ejercido por parte de numerosos factores de crecimiento, como son el PDGF, TGF, FGF, IGF-I y II.

Hoy sabemos acerca de la existencia de células madre “adultas” precursoras de distintos tipos celulares locales en todos los tejidos del organismo, que no deben confundirse con las células madre embrionarias pluripotenciales.

Según las últimas investigaciones en bioingeniería los factores de crecimiento descritos pueden promover a la diferenciación y/o proliferación de los tipos celulares preosteoblastos y de su estirpe (los osteoblastos), estos factores no tendrían ningún efecto sobre la diferenciación celular de estas células madre adultas a preosteoblastos (fase regulada por las

famosas BMPs). En consecuencia, los factores de crecimiento actuarían únicamente sobre esa segunda parte de la diferenciación celular.

El mecanismo fundamental de liberación de factores de crecimiento por los concentrados plaquetarios es de difusión, el cual se basa en los gradientes de concentración de los distintos factores en un momento específico de la cicatrización. La concentración temporal y la distribución espacial de los factores dentro del lugar de injerto dependen de la infiltración del fluido durante la respuesta reparativa inicial, por lo que es importante tener en cuenta estos dos factores a la hora de verificar la eficacia del PRP en la regeneración tisular.^{19, 20.}

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra en constante reabsorción y formación, permitiendo el mantenimiento del volumen óseo, la reparación de los daños tisulares y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. Este fenómeno equilibrado denominado proceso de remodelado permite la renovación de un 5% del hueso cortical y un 20 % del trabecular al año. Aunque el hueso cortical constituye un 75% del total, la actividad metabólica es 10 veces mayor en el trabecular, ya que la relación entre superficie y volumen es mayor (la superficie del hueso trabecular representa un 60% del total). Por esto la renovación es de un 5-10% del hueso total al año.

El remodelado óseo existe toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo.

Es precisamente en la treintena cuando existe la máxima masa ósea, que se mantiene con pequeñas variaciones hasta los 50 años. A partir de aquí,

existe un predominio de la reabsorción y la masa ósea empieza a disminuir⁹³.

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas unidades básicas multicelulares o BMU (*basic multicellular units*). La reabsorción siempre precede a la formación y en el esqueleto joven las cantidades de hueso reabsorbidas son similares a las neoformadas. Por esto se dice que es un proceso balanceado, acoplado en condiciones normales, tanto en el espacio como en el tiempo. La vida media de cada unidad de remodelado en humanos es de 2 a 8 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea. Existen en el esqueleto humano 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años ^{19,20}.

1. Fases del remodelado

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases:

1.1. Fase quiescente: Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

1.2. Fase de activación: Es primer fenómeno donde se da la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, con la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros alargados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos⁹³.

1.3. Fase de reabsorción: Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos que permiten la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).

1.4. Fase de formación: Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

1.5. Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular.

Y de nuevo empieza fase quiescente o de descanso⁹³.

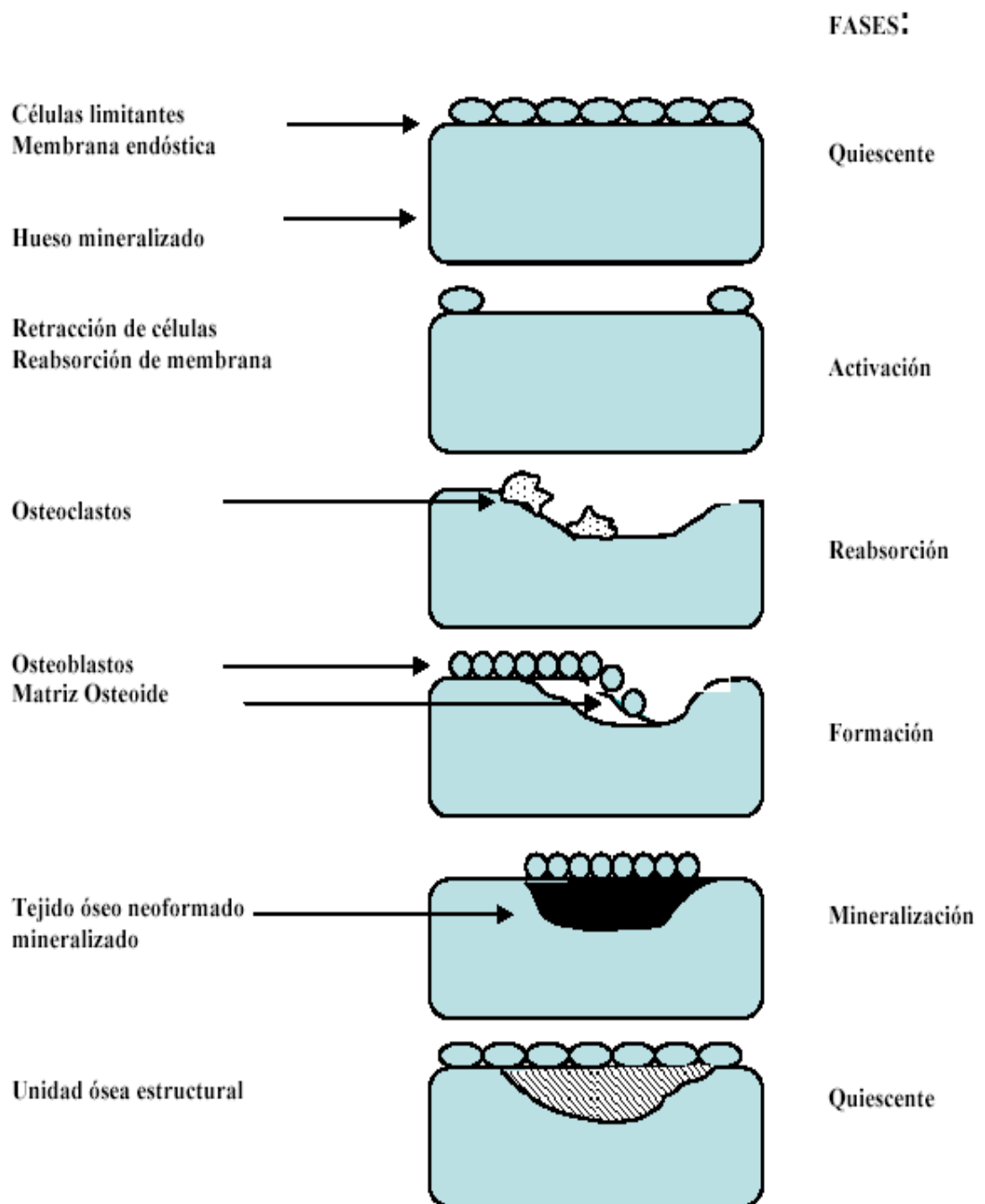


Fig. 1. Fases del remodelado óseo
(Modificado de Compston) (2)

Figura 1 Fases del Remodelado óseo

2. Factores reguladores del remodelado óseo:

El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales.

2.1. Factores genéticos:

Son determinantes muy importantes en el pico de masa ósea, ya que entre el 60 y el 80% de ésta se encuentra determinada genéticamente. Así los sujetos de raza negra poseen una masa ósea mayor que los de raza blanca y éstos mayor que la amarilla. La masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello la predisposición a padecer osteoporosis es mayor en hijas de madres que la padecen.

2.2. Factores mecánicos:

Es imprescindible la actividad física para el buen desarrollo del hueso. Se cree que la acción muscular transmite al hueso una tensión la que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del fluido óseo. Estos osteocitos producen mediadores como óxido nítrico, prostaglandinas e IGF-I, las que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. Por otro lado la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez tienen un efecto deletéreo sobre el hueso que aceleran la reabsorción.

2.3. Factores vasculonerviosos:

Se sabe desde los trabajos de Trueta que la vascularización es fundamental para el normal desarrollo óseo, permitiendo el aporte de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. La vascularización es el primer paso para la osificación: los vasos sanguíneos invaden el cartílago y posteriormente se produce la reabsorción ósea por los osteoclastos, procedentes de los vasos próximos. Igualmente, la neoformación vascular es el primer hecho en el fenómeno de la reparación de fracturas o de la regeneración ósea, ya que la existencia de oxígeno es fundamental para que se produzca la *restitutio ad integrum* y no tejido fibroso. Ham en 1952 constató este fenómeno, al observar que los osteocitos se mueren cuando están lejos de un capilar (la distancia máxima es de 0.1 mm).

Es necesaria la inervación para el normal fisiologismo óseo. El hueso es inervado por fibras nerviosas sensoriales y por el sistema nervioso autónomo. Se han hallado fibras autónomas en endostio, hueso cortical periostio y asociadas a los vasos sanguíneos de los conductos de Volkmann, así como neuropéptidos y sus receptores en el hueso. Como ejemplos de la importancia de la inervación en la fisiología ósea son la osteopenia y la fragilidad ósea presentes en pacientes con desórdenes neurológicos, así como la menor densidad mineral ósea existente en mandíbulas denervadas.

2.4. Factores nutricionales:

Este factor es interesante ya que puede ser modificado. Es necesario un mínimo de calcio para permitir la mineralización que la mayoría de los autores cifran en unos 1.200 mg. diarios hasta los 25 años; después y hasta los 45 no debe ser inferior a 1 gramo y tras la menopausia debe ser por lo menos 1.500 mg al día. Asimismo, se conoce que hábitos tóxicos como tabaco, cafeína, alcohol y exceso de sal constituyen factores de riesgo para la aparición de osteopenia.

2.5. Factores hormonales:

El normal desarrollo del esqueleto va a estar condicionado por un buen funcionamiento del sistema endocrino, en especial de la hormona somatotropa (GH) y las hormonas calcitrópicas (parathormona, calcitonina y metabolitos de la vitamina D). Las hormonas son mensajeros sistémicos que actúan a distancia de su lugar de producción (efecto endocrino), pero también regulan la síntesis y acción de los factores locales, que intervienen directamente en el metabolismo celular (efectos autocrino y paracrino).

Las hormonas más importantes que intervienen en la fisiología ósea son:

2.5.1. Hormonas tiroideas:

Presentan dos acciones contrapuestas en el hueso. En primer lugar, van a estimular la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis de IGF-I. Por esto en el hipotiroidismo congénito (cretinismo) se produce talla baja por alteración de la formación ósea. En segundo lugar, se va a producir un efecto contrario,

estimulando la reabsorción al aumentar el número y función de los osteoclastos. Una manifestación clínica de este efecto es la aparición de pérdida de masa ósea en el hipertiroidismo.

2.5.2. PTH (parathormona):

Esta hormona controla la homeostasis del calcio a través de su acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Es producida en las glándulas paratiroides que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiente por excelencia, al favorecer la reabsorción. Este efecto doble de reabsorción y formación se explica porque la PTH en continua administración estimula la reabsorción ósea a través de la síntesis de un factor favorecedor de la osteoclastogénesis (RANKL) por parte de las células osteoblásticas, mientras que a dosis intermitentes estimula la formación de hueso, asociado a un incremento de los factores de crecimiento mencionados anteriormente y a una disminución de la apoptosis de los osteoblastos.

2.5.3. Calcitonina:

Producida en las células C o parafoliculares del tiroides, su función es inhibir la reabsorción ósea, reducir el número y la actividad de los osteoclastos. Sin embargo, esta acción es temporal, ya que los osteoclastos parecen volverse "impermeables" a la calcitonina en pocos días.

2.5.4. (OH)₂ vitamina D₃ o calcitriol:

Hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización ósea. Es necesaria para el crecimiento normal del esqueleto. Algunos autores piensan que puede ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos.

2.5.5. Andrógenos:

Tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos. Asimismo, actúan de mediadores en el pico de GH existente en la pubertad. Mientras que la deficiencia androgénica se asocia a una menor densidad ósea, la administración de testosterona en jóvenes antes del cierre epifisario incrementa la masa ósea. Igualmente, las mujeres con exceso de andrógenos presentan densidades óseas más altas.

2.5.6. Estrógenos:

Estos son esenciales para el cierre de los cartílagos de conjunción ya que se ha descubierto que juegan un papel importante en el desarrollo esquelético durante la adolescencia. También tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado, favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro lado, disminuyen la reabsorción. Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Investigaciones recientes han comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de

osteoprotegerina (OPG), proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Es por esto que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis.

2.5.7. Progesterona:

Es igualmente anabolizante sobre el hueso, bien directamente, a través de los osteoblastos, que poseen receptores para la hormona o bien de forma indirecta, mediante la competición por los receptores osteoblásticos de los glucocorticoides.

2.5.8. Insulina:

Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente, a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I (factor de crecimiento análogo a la insulina-I).

2.5.9. Glucocorticoides:

A dosis altas tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa1, factores críticos para la osteoblastogénesis. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica.

2.5.10. Hormona de crecimiento (GH):

Tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La GH actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función.

Desde hace unos años se viene considerando a la GH como un factor de crecimiento local, ya que no sólo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos, teniendo un efecto autocrino y paracrino, además de endocrino.

2.6. Factores locales

El remodelado óseo también está regulado por factores locales, entre los que destacan los factores de crecimiento, las citoquinas y recientemente se han implicado las proteínas de la matriz ósea, como moduladoras de la acción de otros factores locales. Las células del hueso también juegan un papel importante por la producción de prostaglandinas y óxido nítrico, así como de citoquinas y factores de crecimiento.

2.6.1. Factores de crecimiento

Son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos, que actúan como moduladores de las funciones celulares,

fundamentalmente sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular.

El biomaterial ideal para regenerar el tejido óseo debe ser osteogénico, osteoinductor y osteoconductor ²⁴, características que solo cumple el injerto autólogo, el cual tiene como desventajas: la morbilidad post operatoria del sitio donante, cantidad limitada de tejido óseo a nivel oral y su alto costo ^{25,19, 26}. En la actualidad, estudios experimentales en animales reportan que la dentina puede ser un biomaterial utilizado en procedimientos de regeneración ósea guiada por tener una matriz orgánica-inorgánica similar a tejido óseo, sin embargo, se requiere más evidencia que sustente la eficacia de la dentina como sustituto óseo ^{26, 27}.

Las células óseas se hallan en el tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (células madre). En los estudios de Friedenstein en 1976 se dio a conocer que las células madre pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes ²².

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares ²⁸, sintetizan la matriz orgánica a un ritmo de 2 a 3 μm por

día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Actualmente, se sabe que:

- 1.- Sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso.
- 2.- Dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular.
- 3.- Contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide gracias a la fosfatasa alcalina.
- 4.- Median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas.
- 5.- Sintetizan factores de crecimiento ²⁹.

Una vez que ya la matriz se mineraliza por la acción de la fosfatasa alcalina, los osteoblastos quedan atrapados en el interior transformándose en osteocitos, mientras que en la superficie se llegan a encontrar algunos osteoblastos y osteoclastos. La célula que predomina en el tejido óseo es el osteocito, tienen forma estrellada y se comunican entre sí mediante sus procesos citoplasmáticos a través de conductos llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse de oxígeno y nutrientes. Cuando se produce un trauma en el hueso, el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que están a más de 0.1 mm de un capilar intacto ³⁰, también los osteocitos controlan el remodelado óseo al detectar variaciones mecánicas de carga, proceso conocido como la mecanotransducción ¹⁹.

Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos²⁰, son las células encargadas de la reabsorción, presentan un gran tamaño (100 µm), son multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas, tienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, actúa inversamente a la fosfatasa alcalina producida por los osteoblastos. Su membrana presenta dos especializaciones: un borde en forma de crestas, donde ocurre la reabsorción ósea y una zona clara rica en microfilamentos con integrinas que le permiten anclarse a la matriz, el espacio que existe entre el osteoclasto y la matriz, es el punto de inicio de la reabsorción, ya que a este nivel el Ph es ácido por la presencia de anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteinasas, etc. Las cuales van a actuar solubilizando a la matriz mineralizada produciendo la reabsorción ósea²⁰.

El 90% de la matriz extracelular (MEC) está constituida por colágeno, sobre todo tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas³². Contiene característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina siendo, este último, un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno y

estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea ³³. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral ³³.

Otra proteína no colágena es la osteocalcina (OCN) y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido γ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos ²².

Las Glicoproteínas presentes son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp). La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal. La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización. Existen varias isoenzimas y, entre ellas la ósea, se ha considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica ²².

Finalmente, el componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben ²².

Ante la pérdida de la pieza dental la estructura ósea que circunda al diente recibe el nombre de reborde alveolar residual en el cual se inicia un periodo de reabsorción ósea que lo altera anatómicamente limitando la cantidad de tejido óseo suficiente para la colocación de implantes dentales, por ello, se realizan procedimientos de regeneración ósea con biomateriales que puedan sustituir el tejido disminuido en el reborde alveolar residual. El Patrón de oro dentro de los sustitutos óseos es el injerto autólogo que es osteogénico, osteoinductor y osteoconductor por presentar: células vivas, matriz ósea y factores de crecimiento provenientes del mismo individuo. En la actualidad, se cuenta con una variedad de biomateriales utilizados en procedimientos regenerativos, clasificados como injertos alógenos (ajeno al sujeto pero proveniente de la misma especie), xenoinjertos (proveniente de una especie distinta, mayormente de origen bovino) y aloplásticos (de origen sintético) que ayudan a preservar las estructuras óseas cuando se encuentran disminuidas ^{25, 34}.

Entre las indicaciones más comunes para la regeneración ósea guiada están: el aumento del reborde alveolar, colocación simultánea de implantes dentales en alveolos post-extracción inmediata, defectos en dehiscencia, colocación de implantes en alveolos post-extracción no inmediata ³⁵.

En los últimos años se ha desarrollado dentro de la investigación médica y odontológica un nuevo campo de conocimiento altamente prometedor, conocida con el nombre de "Ingeniería Tisular". Los principales objetivos de este novedoso campo están encaminados a la regeneración, reparación o reemplazo bioartificial de tejidos y órganos propios del cuerpo humano, que han sido dañados por diversos factores, tales como trauma, quemaduras, por enfermedades adquiridas como el cáncer o ciertas anomalías congénitas ^{36, 37}.

Lo que hoy se denomina Ingeniería Tisular comenzó aproximadamente en 1987, desde sus orígenes, su desarrollo ha sido espectacular y la construcción de tejidos para su uso en medicina empieza a configurarse. Esta se basa principalmente en tres componentes fundamentales: 1) Células, 2) Andamios y 3) Biomoléculas o inductores o factores de crecimiento ³⁸.

Composición y estructura de los tejidos artificiales.

Células: El cuerpo humano posee aproximadamente 100 trillones de células, con aproximadamente 260 diferentes fenotipos que se asocian en el espacio y en el tiempo para formar los tejidos y los órganos ^{37, 39}. Las células que se encuentran más próximas a una lesión pueden restaurar el daño por el denominado mecanismo de diferenciación.

Este último se entiende como la posibilidad que va a tener cada célula de poder diferenciarse ya sea por sus características originales y con posterior capacidad de adquirir propiedades nuevas. Por otro lado, las células que participen en la regeneración de un nuevo tejido deben de contar con la capacidad de reproducirse^{37, 39}.

Andamios: El término biomaterial se designa a aquellos materiales que se utilizan en la fabricación de sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la medicina ^{39, 40}. Deben de ser biocompatibles, o biológicamente aceptables. Deben de permanecer en contacto con los tejidos vivos, por lo que resulta imprescindible que no se produzcan reacciones no deseadas en la interfase tejido-material y que mantenga sus propiedades durante el tiempo que tenga que desempeñar su función ^{38, 41}.

Actualmente los estudios se enfocan a conocer las interacciones específicas entre propiedades físico-químicas del material, química de superficie, hidrofobia, propiedades mecánicas, absorción isotérmica de ciertas proteínas y la observación de comportamientos celulares, como la adhesión, activación, liberación de citoquinas y factores de crecimiento. Existe en la actualidad una gran cantidad de biomateriales diferentes que según su composición se pueden clasificar en biomateriales metálicos, biomateriales cerámicos o biomateriales poliméricos naturales o sintéticos ^{38, 39, 42}.

En la Ingeniería Tisular, los biomateriales deben favorecer la función biológica y mecánica de las células ya que actúan como una matriz

extracelular artificial. Como resultado, los biomateriales pueden proporcionar a las células un espacio en tres dimensiones para formar los tejidos nuevos con la estructura y función apropiada ^{38, 43}.

Como la mayoría de los tipos de células de mamíferos son dependientes de anclaje y pueden morir sino hay una base de adhesión celular; los biomateriales proporcionan un sustrato de adhesión que ofrece a las células sitios específicos en el cuerpo con una eficiencia de carga. Los biomateriales también pueden proporcionar propiedades mecánicas que sirven de apoyo en contra de las fuerzas, como las diseñadas con una estructura tridimensional.

Además, las señales bioactivas, como los péptidos de adhesión celular y factores de crecimiento, se puede integrar junto con las células para ayudar a regular la función de las mismas ^{40, 41}.

Biomoléculas, inductores o factores de crecimiento.

La célula responde al medioambiente extracelular detectando señales químicas o estímulos físicos que desencadenan la apropiada respuesta de las mismas mediante la activación de distintos mecanismos moleculares y biológicos que conducen a división, migración, diferenciación, mantenimiento del fenotipo o apoptosis ⁴¹. La actividad coordinada de estos procesos por parte de las células que forman un tejido conducen a la definición estructural y funcional de un tejido en un momento temporal determinado ³⁹.

La mayor parte de la información que sobre señales moleculares se utiliza hoy en Ingeniería Tisular procede de estudios realizados con poblaciones aisladas en cultivos sobre las que se han aplicado distintos factores solubles. Se trata de los denominados factores de crecimiento ³⁸.

La participación de estas sustancias en la construcción de nuevos tejidos es fundamental pues contribuyen a su crecimiento y desarrollo al igual que ocurre en condiciones ortotípicas. El mecanismo por el cual pueden introducirse en el nuevo tejido con ciertas garantías, aparte de su inyección por vía directa, que conduce a una rápida eliminación debido a la corta vida de los mismos, es su incorporación en los biomateriales de soporte, lo que permite una exposición y liberación prolongada de dichos factores, controlable por la tasa de difusión de los mismos o por la degradación del polímero ^{39, 40, 41}.

Regeneración de tejidos orales mediante Ingeniería Tisular.

Complejo dentino-pulpar:

A partir de la década pasada se han reportado trabajos encaminados a la reparación de tejido pulpar, mediante técnicas que permitan la regeneración de tejido, en lugar de su eliminación total. Con el inicio de la era de la Ingeniería Tisular la posibilidad de regenerar tejido se ha tornado tangible y ha dado la pauta a lo que nuestro grupo de investigación denomina: “**Endodoncia biológica**”.

Estudios preliminares implican la formación de coágulo en presencia de tejido remanente y antibióticos en pacientes jóvenes, los cuales han presentado resultados favorables ⁴⁴; sin embargo, una alternativa es la regeneración mediante “constructos tisulares”, que al ser implantados se diferencien a tejido pulpar, estos constructos conformados por un andamio inteligente, biomoléculas ⁴⁵ y células madre autólogas, constituyen en si una estrategia versátil ya que las condiciones de diseño del constructo podrían adaptarse a las necesidades de cada paciente ^{46, 47}. Entre los resultados más destacados cabe mencionar la neoformación de tejido vascularizado semejante al tejido pulpar, en un estudio en biomodelos realizado en 2010 por Nör et al ⁴⁸.

Aunque aún hay aspectos que deben afinarse, como los irrigantes más adecuados que favorezcan las condiciones de mantenimiento celular, el nivel de tejido que debe eliminarse, el tipo de antibióticos más adecuados o el nivel de inserción del constructo; la Endodoncia Regenerativa es una terapia inminente; por lo que es indispensable un mayor acercamiento a los avances en este rubro de modo que estemos preparados para la traslación clínica de esta terapia.

Tejido óseo:

Entre los tejidos más resistentes, pero también más propensos a ser lesionados o destruidos, se encuentra el tejido óseo, por esta razón los trabajos de investigación sobre la reparación de defectos óseos comenzaron hace varios siglos; en sus inicios se emplearon materiales

metálicos o yeso y evolucionó hasta la aplicación de xenoinjertos, aloinjertos y autoinjertos en las últimas décadas ^{49, 50}.

En Odontología, los defectos óseos son afecciones que oscilan desde recesiones que miden milímetros hasta la resección completa de la mandíbula, y que son tratadas, por ejemplo, con hueso liofilizado, membranas o bien prótesis metálicas, que en la mayoría de los casos devuelven la función de manera limitada. En esta área el éxito de la ingeniería tisular ha rebasado por mucho las expectativas⁵¹.

El desarrollo de nuevos andamios con propiedades físicas, químicas y mecánicas debe seguirse explorando; actualmente, la combinación de colágeno, hidroxiapatita y VEGF o bien péptidos osteogénicos y células madre, es el biocomplejo idóneo También se está explorando el uso de materiales provenientes de la naturaleza como la celulosa o nuevos híbridos poliméricos como el PLGA-caprolactona. Por otra parte, la nanotecnología es una disciplina que ofrece a la Ingeniería Tisular nuevas dimensiones de control molecular, guía de crecimiento celular, comunicación intercelular entre otros aspectos fundamentales para la osteogénesis. Los beneficios de estos avances terapéuticos, para la regeneración de defectos óseos en Odontología, que se convertirán pronto en un tratamiento asequible, brindarán ayuda a un gran número de pacientes.

Mucosa oral.

Es uno de los tejidos más abundantes, su misma pérdida a causa de diversos procedimientos o traumatismos va a ser un auténtico problema ante la necesidad de obtener una adecuada cobertura que repare el defecto original. La creación de mucosa oral *in vitro* nace como la mejor alternativa para la solución de esta problemática, ya que resuelve el rechazo, la cantidad limitada de tejido y abre la posibilidad de usarla para exámenes toxicológicos.

Diferentes Alternativas de Relleno óseo:

Los injertos óseos tienen una función mecánica y biológica.

En la interfase injerto óseo-huésped existe una compleja relación donde múltiples factores pueden intervenir para una correcta incorporación del injerto, entre ellos se encuentran la vascularización del injerto, técnicas de conservación, factores locales, factores sistémicos y propiedades mecánicas (dependen del tipo, tamaño y forma del injerto utilizado).

Así mismo para reconstrucciones dentarias a través de tratamientos implantológicos es esencial un adecuado volumen óseo para la oseointegración de allí la importancia de conocer por parte del odontólogo el comportamiento del tejido óseo y los mecanismos biológicos por los cuales actúan los materiales.

Uno de los componentes destacados del sistema estomatognático es el hueso alveolar. Esta es una estructura odontodependiente, ya que se forma

junto con los elementos dentarios, los sostiene mientras cumplen su función y desaparece una vez que los dientes se pierden.

Dentro de los biomateriales utilizados para regeneración ósea se describen los de relleno o injerto (productos biológicos que rellenan los defectos óseos) y los materiales de aislamiento o barrera (Son biomateriales naturales o sintéticos que actuando como barrera evitan que ciertos tipos celulares invadan un espacio concreto permitiendo así la proliferación de grupos celulares específicos). Los mecanismos biológicos por los cuales actúan dichos materiales son objeto de estudios experimentales y clínicos en los últimos años ⁵².

Desarrollo:

La formación ósea inducida por biomateriales, sea cual fuere el mecanismo que la provoca, refleja principalmente una modificación en el microambiente celular. En general, después del establecimiento de un tejido conjuntivo inmaduro y bien vascularizado, la formación ósea continúa con un reclutamiento, proliferación y diferenciación de células osteoblásticas con secreción de colágeno, proteínas de la matriz y posterior mineralización ⁵³, ⁵⁴.

Específicamente el hueso alveolar se encuentra sometido a procesos continuos de remodelación regulados por factores sistémicos como la hormona paratiroidea, vitamina D3, insulina, hormona de crecimiento, glucocorticoides, proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento transformante B, factor de crecimiento semejante a insulina, factor de crecimiento fibroblástico y factor de crecimiento derivado de plaquetas⁵⁵.

Cuando se colocan materiales de relleno existe una interacción entre las partículas del mismo con el ambiente que lo rodea, especialmente el tejido óseo. Este fenómeno reviste una importancia fundamental para el éxito del injerto. De allí la trascendencia del conocimiento de los componentes.

Teniendo en cuenta esta relación de matriz-células óseas y tratando de aprovechar la comunicación molecular entre ambos se han utilizado diferentes materiales que incluyen injertos óseos autólogos, materiales alogénicos, xenogénicos, sustitutos óseos, técnicas de regeneración óseas guiada y el uso de proteínas óseas morfogenéticas.

En este sentido, los diferentes materiales utilizados pueden actuar por al menos uno de estos tres mecanismos bien descritos en la bibliografía ^{56, 57}:

- **Osteogénesis:**

Síntesis de hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere células capaces de generar hueso.

- **Osteoinducción:**

Es un proceso que estimula la osteogénesis, por el que las células madres mesenquimatosas son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo.

Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas 2, 4 y 7, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleuquinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico, factores estimuladores de las colonias de granulocitos-macrófago.

También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina. Los materiales osteoinductivos pueden hacer crecer hueso en la zona donde normalmente no se encuentra.

- **Osteoconducción:**

Es un proceso por el cual el material provee un ambiente, estructura o material físico apropiado para la aposición de hueso nuevo. Se desencadena un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular, y células madres mesenquimatosas, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón previsible, determinado por la biología del injerto y el entorno mecánico de la interfase huésped-injerto.

El injerto óseo ideal debería tener estas tres propiedades además de ser biocompatible y proporcionar estabilidad biomecánica.

Se puede definir la biocompatibilidad cuando un material se considera compatible y solo provoca reacciones deseadas o tolerables en el organismo vivo.

Con la finalidad de lograr alguno de los procesos nombrados anteriormente, los injertos óseos han sido objetivo de estudios durante más de cuatro décadas. Entre las diferentes opciones se pueden citar^{58,59}:

a) Injertos autólogos o autógenos:

Actúan a través de los tres mecanismos biológicos osteogénesis, osteoconducción, osteoinducción.

Es hueso obtenido del propio paciente. Puede ser de hueso esponjoso, corticales vascularizadas o corticales no vascularizadas y los distintos tipos de injertos pueden tener distintas propiedades. El mejor material de relleno es el hueso autólogo cortico esponjoso o particulado de esponjoso que puede formar hueso nuevo por mecanismo de osteogénesis, osteoconducción y tiene escasa capacidad antigénica. Se obtienen de sitios intraorales (mentón, tuberosidad del maxilar, rama ascendente) que se usan para pequeños defectos o extraorales (cresta ilíaca, tibia o calota) cuando se requiere mayor cantidad. La elección de cada abordaje dependerá del tipo, tamaño y forma de la cavidad ósea, la experiencia clínica y preferencia del profesional. El hueso autógeno esponjoso es el que tiene mayor capacidad osteogénica y los injertos corticales son los que proporcionan mayor estabilidad.

Sin embargo, la obtención de autoinjertos óseos requiere un procedimiento quirúrgico en el sitio donante con el consiguiente riesgo de morbilidad postoperatoria, infección, dolor, hemorragia, debilidad muscular, lesión neurológica, entre otras. También aumenta considerablemente el tiempo quirúrgico y en algunos casos la cantidad de injerto extraído puede ser insuficiente.

También papilla de hueso, que se recoge en un filtro durante una osteoplastia/osteotomía realizada simultáneamente, se puede volver a implantar en una bolsa.

b) Injertos homólogos, alogénicos o aloinjertos ^{60, 61:}

Proceden de individuos de la misma especie; pero genéticamente diferentes.

Se pueden clasificar según su procesamiento en:

- Aloinjertos congelados.
- Aloinjerto iofilizado (secado en frío).
- Aloinjerto iofilizado y desmineralizado.
- Hueso irradiado.

Aunque este material se promocione como osteoinductor, por los resultados obtenidos a través de estudios experimentales en tejidos extraóseos (tejido celular subcutáneo) se consideran biocompatibles y osteoconductores.

Las ventajas del aloinjerto incluyen su disponibilidad en cantidades importantes y diferentes formas y tamaños, no se sacrifican estructuras del huésped y no hay morbilidad del sitio donante. Las desventajas se relacionan con la calidad del tejido óseo regenerado, que no siempre es previsible. Necesitan un procesado para eliminar su capacidad antigénica.

c) Injertos heterólogos o xenoinjertos

De origen natural, provienen de otra especie (animales) y contienen los minerales naturales del hueso. Se ha informado que la porosidad y la superficie de estos materiales resulta en una mejor respuesta osteogénica.

Por ejemplo, hueso bovino y derivados del coral (Ostrix, Osteogen, Bio-Oss, Interpore).

El uso de hueso mineral desproteínizado de bovino (Bio.oss, Osteohealth Suiza) ha sido estudiado y se ha comprobado que ofrece verdaderas ventajas en zonas de alta demanda estética, ya que sirve como apoyo para el tejido blando.

Otros estudios a largo plazo mostraron que la colocación de bio-oss en un alveolo pos exodoncia impide la contracción marginal del reborde que ocurre luego de la extracción dentaria.

Las propiedades del bio-oss son similares a las del hueso humano la estructura porosa del mismo ofrece espacio para las células sanguíneas y el depósito de nuevo hueso. La microestructura de la superficie del bio-oss soporta la adhesión de los osteoblastos que son los responsables de la formación del hueso.

d) Injertos aloplásticos o sintéticos ⁶²:

Provenientes de materiales fabricados sintéticamente.

Se encuentran en variadas formas, tamaños y texturas Las respuestas biológicas óseas dependerán de las técnicas de fabricación, la cristalinidad, porosidad y grado de reabsorción.

Pueden ser: Cerámicos: son los de uso más común, por ejemplo el fosfato de calcio sintético (hidroxiapatita y fosfato tricálcico). Polímeros: como Bioplan, HTR. Vidrio Cerámico bioactivo: compuesto de sales de calcio y fosfato, y sales de sodio y silicio (Biogass, Perioglass, Biogran) El principal mecanismo de acción de estos materiales es osteoconducción. Los materiales osteoconductivos deben tener una porosidad que permita la vascularización y provea un área de adherencia a las células osteogénicas. El tamaño del poro óptimo para que esto ocurra es entre 100 y 500 Mn con un volumen total de poros de 75/80 además los compuestos deben ser no inmunogénicos y el hueso debe tener una capacidad alta de adherencia a los mismos.

Estos materiales han sido estudiados teniendo en cuenta su histomorfometría y biología molecular obteniendo resultados óptimos.

Un factor importante a considerar es mantener el injerto en su posición y evitar que los tejidos blandos interfieran la cicatrización ósea. Durante los primeros momentos de cicatrización del material de injerto, se produce una competición entre el tejido óseo y el blando para rellenar la cavidad y el tejido blando prolifera más rápido tendiendo a cerrar la cavidad.

El desarrollo de las membranas de regeneración ósea guiada ha demostrado su utilidad para asistir y ayudar en los injertos óseos.

Dentro de los materiales de barrera, encontramos las membranas para osteopromoción.

La osteopromoción es el sellado por medios físicos de un sitio anatómico, para impedir que otros tejidos invadan el coágulo óseo e interfieran con la regeneración ósea. Este es el mecanismo por el cual actúan las membranas de regeneración tisular guiada. En la actualidad existen dos grupos de membranas para regeneración.

— **Reabsorbibles.** Estas membranas presentan capacidad de ser reabsorbidas por el organismo. El periodo de reabsorción depende del material que las constituye, esto es un punto crítico dado que al no ser necesaria su remoción, su función depende del tiempo que permanezcan en el organismo.

Se clasifican de acuerdo a su composición en:

- Colágeno: Obtenido de tendón bovino purificado (colágeno tipo I), ej.: Biomed (Zimer-USA) se reabsorbe aproximadamente a las 6 o 7 semanas.
- PLA-PGA: (ácido poliláctico-ácido poli glicólico) son más rígidas y su tiempo de reabsorción es de 6 a 8 semanas, ej.: Resolut (Goretex USA)
- Polímero líquido sintético.

- Poliglactina.
- Sulfato de calcio.

— **No reabsorbibles.** Son membranas constituidas por teflón (politetrafluoruro de etileno PTFE) De acuerdo al tratamiento del material pueden ser expandidas o no. Estas membranas poseen la desventaja de requerir una segunda cirugía para su remoción, que se puede acelerar en caso de exposición o infección.

El periodo ideal de mantenimiento de la membrana debe ser de 6 meses, pero se puede modificar según el caso clínico en particular.

AUTOINJERTO DENTAL PARTICULADO:

El Autoinjerto dental particulado es un material de injerto óseo consiste en 55% de hidroxiapatita inorgánica (HA) y 45% de sustancias orgánicas e inorgánicas posee propiedades de hueso en términos de la combinación y la disociación de calcio y fosfato⁷.

Las sustancias orgánicas incluyen la proteína morfogenética de hueso y proteínas que tienen la capacidad de osteoinducción, así como el colágeno de tipo I idéntica a la encontrada en el hueso alveolar.

Es útil ya que soporta una excelente capacidad de regeneración ósea y reduce al mínimo la posibilidad de reacción a cuerpo extraño, enfermedades genéticas y la transmisión de enfermedades.

Viene a ser un sistema que trata a los pacientes mediante la fabricación de material de injerto óseo de sus propios dientes extraídos. Es uno de los materiales de injerto óseo se dividen en tipos de bloques y en polvo. El tipo de bloque tiene osteoinducción, la capacidad a través de la sangre de humectabilidad y capacidad osteoconducción mediante el espacio y rastrero sustitución y mantenimiento de espacio habilidades; que es remodelado por el espacio durante un período específico. El tipo de polvo se suministra en base a varios tamaños de partículas, porosidad entre polvos y humectabilidad sangre, osteoconducción, osteoinducción y reptiles capacidades de sustitución.

Con los datos anteriores, diente auto material de injerto óseo es muy útil en situaciones clínicas porque es compatible con la regeneración ósea excelente a través de la osteoinducción y la capacidad de osteoconducción y minimiza la reacción de cuerpo extraño debido a la homogeneidad genética⁶⁵.

PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (PRGF):

Las plaquetas son células sanguíneas enucleadas contenidas en el plasma sanguíneo, y aunque poseen una estructura compleja, son pequeños discos redondos u ovals de 2 a 4 μ de diámetro cuya concentración normal en sangre oscila entre 150.000 y 300.000 por microlitro^{64,65}. En ellas se encuentran los llamados gránulos alpha a que contienen un grupo de factores de crecimiento (FC) que, al liberarse, hacen posible la multiplicación y el desarrollo de las células endoteliales vasculares, de las células

musculares lisas y de los fibroblastos, y ejercen múltiples efectos sobre los fenómenos de remodelación celular^{65,66}, permitiendo que interactúen recíprocamente con los leucocitos y con las células endoteliales para modular la reacción inflamatoria en los procesos de cicatrización y de regeneración tisular. La mayoría de éstos FC son proteínas de bajo peso molecular que varían entre 1.000 y 4.000 daltons. Cada factor posee un tejido u órgano sobre el cual actuar, aunque todos los tipos de células responden a uno o más factores al mismo tiempo⁶⁷.

Las plaquetas tienen una semi-vida útil de 8 a 12 días, al final de la cual acaba su ciclo vital y después son eliminadas de la circulación principalmente por el sistema de macrófagos titulares⁶⁸.

En 1995 Slater menciona la posibilidad de estimular la proliferación ósea utilizando factores de crecimiento plasmáticos. Al aislar y aplicar las proteínas responsables de la cicatrización de las heridas y regeneración de los tejidos en la zona a tratar, el proceso de reparación se acelera, disminuyen las complicaciones postquirúrgicas, el dolor y la inflamación, optimizando la capacidad de regeneración del organismo.

Hasta el momento no se han reportado efectos negativos. La epitelización se ha reportado total en 100% de los casos y significativamente mejor que en las áreas que no han sido tratadas con PRGF. En cuanto a la regeneración ósea, se han encontrado diferencias, mayor calidad y cantidad que en pacientes no tratados con PRGF.

Los factores de crecimiento son los mediadores biológicos que ponen en marcha el proceso de regeneración ósea los cuales se almacenan en las plaquetas, como son, el factor derivado de las plaquetas, factor de crecimiento fibroblástico y factor de crecimiento semejante a la insulina.

Dentro de los beneficios que aporta el PRGF son el incremento de la vascularización de los tejidos, acelera la regeneración de tejidos blandos, reduce el edema, promueve la epitelización (formación de piel y mucosa) e induce a la formación ósea.

Esta opción de tratamiento ha beneficiado especialmente a los pacientes con antecedentes de tabaquismo y a los diabéticos dadas sus alteraciones en la circulación sanguínea que los lleva a ser más susceptibles a no consolidar fracturas, mala cicatrización ósea y de estructuras blandas.

La función del PRGF al actuar en conjunto activan el metabolismo óseo. Estimulan la regeneración periodontal. Aceleran el proceso de cicatrización. Por lo que se les considera los inductores de crecimiento óseo ideales.

Los factores de crecimiento son fundamentales en la reparación ósea y el empleo de los mismo tiene muchas ventajas, tales como mayor velocidad en la formación de hueso neoformado y aumento en el trabeculado óseo durante la reparación.

El empleo del PRGF, favorece la formación de un nuevo ligamento periodontal, hueso y cemento de tipo celular, tanto en cantidad, calidad y velocidad.

Las posibilidades de contagios y complicaciones son mínimas ya que solo se utiliza sangre del propio paciente sin necesidad de mezclarla con ningún hemoderivado que pudiera tener el mínimo efecto antigénico o de contagio. Esta opción de tratamiento beneficia especialmente a los fumadores y a los diabéticos dadas sus alteraciones en la circulación sanguínea que los lleva a ser más propensos a no consolidar fracturas, mala cicatrización del hueso y de las partes blandas.

Slater y cols. En 1995 mostraron un trabajo in vitro, resultados que indican un aumento en la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos, y un incremento en la síntesis de la matriz extracelular cuando se cultivan dichos osteoblastos en presencia de factores de crecimiento plaquetarios.

En 1995 Slater menciona la posibilidad de estimular la proliferación ósea utilizando factores de crecimiento plasmáticos. Al aislar y aplicar las proteínas responsables de la cicatrización de las heridas y regeneración de los tejidos en la zona a tratar, el proceso se acelera, disminuyen las complicaciones postquirúrgicas, el dolor y la inflamación, optimizando la capacidad de regeneración del organismo.

Hasta el momento no se han reportado efectos negativos. La epitelización se ha reportado total en el 100% de los casos y significativamente mejor en las áreas que no han sido tratadas con PRGF.

Estas investigaciones inician con Marshall Urist en 1965 donde describe la importancia de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) en la regeneración de tejidos. Mientras que Tayapongsak (1994), concentró su

atención en los mecanismos intrínsecos de la respuesta celular, precisándose en la fibrina adhesiva autóloga (AFA).

Factores de crecimiento presentes en el PRP:

Bioquímicamente, el PRP se compone de suero, leucocitos, plaquetas y factores de crecimiento, pero aunque la presencia conjunta de todos estos elementos favorece la acción del PRP, los elementos fundamentales son los factores de crecimiento, que ejercen la función de regeneración del lecho donante y que, en líneas generales, son el factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), el factor de crecimiento de transformación-beta (TGF-beta), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) ⁷⁰.

PDGF (Factor de Crecimiento de Origen Plaquetario):

- Promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos, por un mecanismo de quimiotaxis.
- Activador de macrófagos.
- Mitógeno de células mesenquimales.
- Facilita la formación de colágeno tipo I.

TGF-BETA (Factor de Crecimiento de Transformación Beta):

- Quimiotaxis.
- Proliferación y diferenciación de las células mesenquimales.
- Síntesis de colágeno por los osteoblastos.
- Pro-angiogénesis.
- Inhibe la formación de osteoclastos

- Inhibe la proliferación de células epiteliales en presencia de otros factores.

FGF (Factor de Crecimiento Fibroblástico):

- Proliferación y diferenciación de los osteoblastos.
- Inhiben los osteoclastos.
- Proliferación de fibroblastos e inducción de la secreción de fibronectina por estos.
- Pro-angiogénesis por acción quimiotáctica sobre células endoteliales.

IGF (Factor de Crecimiento Similar a la Insulina):

- Proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de revestimiento.
- Síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno I por los osteoblastos.

VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular):

- Quimiotaxis y proliferación de células endoteliales
- Hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos.

EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico):

- Mitógeno, proapoptótico, quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos.

TABLA 1					
	Proliferación pre/osteoblastos	Proliferación fibroblastos	Quimiotaxis	Síntesis de matriz extracelular	Vascularización
PDGF	++	++	+	+	*
TGFβ	+/-	+/-	+	++	*
EGF	-	++	+	*	-
IGF	++	+	++	++	-
VEGF	+		-	-	++

++ Gran Aumento; + Aumenta; - Sin efecto; * Efecto indirecto (4).

PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO:

Anitua (1999) propone utilizar el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). En donde las plaquetas contienen algunos factores de crecimiento, como: Factor de crecimiento transformador -B1 (TGF-B1), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Factor de crecimiento insulínico (IGF-I) dichas proteínas tienen propiedades, como la migración celular dirigida (quimiotaxis), proliferación y diferenciación celular, todos estos acontecimientos claves en los procesos de reparación y regeneración. La técnica diseñada por él, que ha sido desarrollada por el laboratorio Biotechnology Institute (BTI), consiste en la extracción de 20 centímetros cúbicos de sangre del paciente. La cual se centrifuga para diferenciar las distintas fracciones de plasma y separar la porción más rica en factores de crecimiento.

Esta técnica consiste en:

1. La selección de las venas; metacarpianas o antecubitales y la extracción de 20 centímetros cúbicos de sangre.

2. La introducción de la sangre en tubos estériles con citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante. Se centrifuga 1,800 rpm (450 g) durante 8 minutos para separar el plasma donde se obtienen tres fracciones:

Fracción 1, corresponden a los primeros 500 μ L (0.5 cc) que se considera un plasma pobre en plaquetas y por lo tanto pobre en factores de crecimiento.

Fracción 2, corresponden a los siguientes 500 μ L (0.5 cc) obteniendo un plasma con un número de plaquetas similar al que tiene la sangre periférica.

Fracción 3, los siguientes 500 μ L (0.5 cc) considerando la porción del plasma más rico en plaquetas, encontrándose inmediatamente después de la serie roja.

3. Pipeteo de las muestras.

- Primero, con una pipeta de 500 μ L (0.5 cc) se aspira la fracción superior (fracción 1) y se traslada a un tubo de cristal estéril, previamente etiquetado. Repitiendo lo mismo con el tubo 2, por lo tanto ésta será la fracción de plasma más pobre

en plaquetas.

- Segundo, con la pipeta de 500 μ L (0.5 cc) se aspira la fracción 2 en ambos tubos y se traslada a un tubo de cristal estéril. Esta fracción de plasma (f2) contiene un número de plaquetas por unidad de volumen similar a las contenidas en la sangre periférica.

- La tercera fracción de plasma (f3) es la más importante por su alto contenido en plaquetas. Se

realiza un pipeteo cuidadoso, utilizando para ello una pipeta de 100 μ L (0.1 cc) con el fin de evitar

turbulencias y no aspirar los hematíes. Repitiendo el pipeteado cinco veces y se lleva a un tercer

tubo de cristal estéril, éste será el plasma más rico en factores de crecimiento (PRGF) (Fracción 3). Los 0.2 cc de plasma que están más próximos a los hematíes son los que tienen el contenido más alto en plaquetas.

4. Activación y agregación de las plaquetas.

Una vez que tenemos la fracción de plasma que vamos a utilizar, realizaremos la activación del coágulo utilizando cloruro de calcio al 10% para inducir la activación plaquetaria y la exocitosis de los gránulos α . El calcio actúa como cofactor necesario para la agregación plaquetaria.¹¹ Se forma un tapón gelatinoso muy consistente y de fácil manipulación.

Cuando se activa se inicia la cascada de coagulación, con la transformación de las plaquetas se liberan los factores de crecimiento, y la coagulación del fibrinógeno por lo que se debe hacer unos 10 minutos antes de su utilización, pudiendo acortar los plazos con un baño térmico a 37 °C.

El gel obtenido de color amarillo-rosado contiene PRGF (Plasma rico en factores de crecimiento) y el de color transparente PPP (plasma pobre en plaquetas).

La preparación obtenida de PRGF puede ser combinada con un material osteoconductor, como injertos autógenos o aloinjertos, mejorando así la consistencia y el manejo del mismo.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO:

La Histopatología es la rama de la Patología que trata el diagnóstico de enfermedades a través del estudio de los tejidos.

Las muestras tomadas se fijan en alcohol al 80% o formalina con buffer. El alcohol tiene la ventaja de producir una fijación adecuada y de permitir el almacenamiento a temperatura ambiente por largo tiempo, hecho particularmente importante cuando las muestras deben ser enviadas para su procesamiento. La formalina con buffer fosfato es un buen fijador, pero las muestras deben ser removidas en 48 horas para evitar la disolución del material. Luego son deshidratados en alcohol absoluto. Después de la impregnación de 8 días a 4 °C en una solución de metacrilato (600mL de metimetacrilato, 150 mL de dibutilfalato y 625.5 g de catalizador (benzoin peróxido), las muestras son incluidas en metilmetacrilato a 32°C. El corte del bloque se realiza con un micrótopo de Jung de tipo K y Reichert policut equipado con cuchilla de tungsteno. Los cortes son de 8 µm (de 4 a 20).

Muchos métodos de tinción son válidos, el único requisito es usar uno que permita la identificación inequívoca del osteoide y de las células óseas. El solocromo cianina R (solución acuosa al 1%) es un buen material del osteoide, con la misma capacidad de discriminar que el de Von Kossa, reconocido como método de referencia. El solocromo cianina R también es conveniente para las muestras de volumen óseo con el uso de un analizador de imágenes porque produce un claro contraste entre el hueso trabecular coloreado y los espacios medulares. En contraste, la coloración tricómica de Goldner subestima el volumen y la superficie osteoide aunque es excelente para evaluar los parámetros de resorción.

El análisis del doble marcado con tretaciclina es posible como procedimiento de 15 a 20 μm de espesor.

Mediciones y Parámetros para el análisis Histopatológico:

Para las secciones de hueso realizadas en muestras óseas pueden utilizarse diferentes métodos de medición. Todos se basan sobre el principio de Delesse, el cual permite la deducción de información numérica tridimensional a partir de imágenes bidimensionales.

El método de evaluación más antiguo denominado “manual” utiliza diferentes tipos oculares integrados con la superposición de una grilla. El porcentaje de cruces sobre la estructura o el número de intersecciones entre la grilla y el perímetro óseo son estimaciones precisas de la superficie o de la densidad volumétrica del componente en análisis. Este sistema manual de conteo todavía es el más usado, aunque requiera de numerosos campos e insuma mucho tiempo.

El segundo método usa una imagen analizada por computadora la cual reduce considerablemente el tiempo de análisis. Estos artefactos completamente automatizados también son aptos para la medición del volumen óseo o la densidad, pero no son satisfactorios para la evaluación de la superficie de remodelado o los parámetros dinámicos, los cuales tienen que ser identificados dinámicamente, los cuales tienen que ser identificados cualitativamente antes de su cuantificación. Además, a pesar de avances recientes en técnicas de imágenes, estas computadoras no son capaces de identificar células o artefactos de las tinciones o los cortes.

Finalmente, un método eficiente es el uso de los analizadores de imágenes semiautomático, el cual combina las ventajas de la discriminación por un investigador, con tiempo de evaluación reducido los resultados de análisis y cálculos de la computadora.

La nueva nomenclatura para histomorfometría ósea propuesta por el comité de la American Society of Bone and Mineral Research es la extensamente utilizada en la actualidad:

-Volumen óseo trabecular (BV/TV): Representa el porcentaje de tejido trabecular (ocupado por trabéculas), excluido el espacio medular pero incluido el tejido calcificado y el osteoide.

-Superficie osteoide (OS/BS): Es el porcentaje de perímetro trabecular que es ocupado por osteoide con osteoblastos o sin ellos.

-Espesor osteoide (Oth): Es el promedio del espesor del osteoide que cubre la superficie de las trabéculas.

-Superficie de resorción (ES/BS): Es el porcentaje de superficie trabecular ocupada por lagunas de Howship con osteoclastos o sin ellos.

-Superficie osteoblástica (Ob S/BS): Es el porcentaje de superficie trabecular ocupada por osteoblastos.

-Superficie Osteoclástica: (Oc S/BS): Es el porcentaje de superficie trabecular que es ocupada por osteoclastos.

-Superficie Mineralizada (MS/BS): Es el porcentaje de superficie trabecular que está mineralizada y por ende marcada con tetraciclina. Incluye simple o doble marcado. La MB/BS se usa para el cálculo de los

grados de formación, el período de formación ósea y varias expresiones del tiempo de mineralización, por lo cual es importante que se defina estrictamente⁹².

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:

Regeneración ósea guiada: La regeneración ósea guiada es un concepto moderno, que implica el uso de diferentes materiales y métodos, que tienen como objetivo crear hueso sano y suficiente, en los procesos alveolares de los maxilares, para cubrir defectos óseos periodontales o para tener procesos alveolares adecuados, en donde colocar prótesis dentales de manera convencional, o con implantes dentales osteointegrados. Estos últimos son un gran avance en la Odontología actual pero requieren para su colocación una cantidad suficiente de hueso alveolar, de buena calidad, que los cubra y soporte.

La regeneración ósea guiada con injertos óseos autólogos y membrana de teflón o politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), esterilizada en gas de óxido de etileno, es recomendable en la regeneración ósea de procesos alveolares deficientes, alrededor de implantes oseointegrados con defectos óseos periféricos, o en casos de fracturas mandibulares complicadas con pseudoartrosis. Esto es así porque los resultados observados son muy positivos, además que conlleva una reducción considerable de los costes del tratamiento ¹⁶.

La regeneración ósea guiada implica colocar una barrera que cubra el defecto óseo, separándolo del tejido gingival (epitelio y tejido conectivo), y evitando su contacto con el hueso durante la cicatrización. Así se permite

su regeneración y que el defecto óseo sea rellenado. Los estudios clínicos e histológicos de este procedimiento, han demostrado que las membranas de barrera deben estar perfectamente adaptadas al hueso periférico, es decir, al defecto, formando un sello que impida el ingreso de células de tejido conectivo gingival al espacio formado bajo la membrana, ya que éstas compiten con las células formadoras de hueso. Por ello es imprescindible que la membrana se mantenga estable durante el período de cicatrización.

Autoinjerto Dental Particulado: El material de autoinjerto dentario particulado es un sistema que trata a los pacientes mediante la fabricación de material de injerto óseo de sus propios dientes extraídos. El autoinjerto dental es un material de injerto óseo consiste en 55 % y 45 % inorgánica sustancias orgánicas. Entre las sustancias inorgánicas, hidroxiapatita (HA) tiene las características de la combinación y la disociación de calcio y fosfato como las del hueso.

Injerto: Es un procedimiento quirúrgico para trasladar tejido de una parte del cuerpo a otra, o de una persona a otra, sin llevar su propio riego sanguíneo con él. En lugar de eso, crece una nueva irrigación sanguínea en la zona donde se coloca. La técnica similar donde el tejido es transferido con la irrigación sanguínea intacta se denomina colgajo. En algunas ocasiones un injerto puede ser un dispositivo creado artificialmente, como por ejemplo los tubos para llevar el fluido sanguíneo a través de una malformación o desde una arteria a una vena usados en hemodiálisis. El término injerto es sobre todo aplicado a los injertos de piel, sin embargo

pueden ser injertados muchos tipos de tejidos: piel, huesos, nervios, tendones, neuronas, etc ¹⁵.

Histopatología: El estudio de la estructura microscópica de los tejidos (especialmente por medio de análisis asistido por ordenador de microfotografías)⁷⁰.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y Diseño de la Investigación:

Tipo de Investigación: Cuantitativa

Diseño:

a. De acuerdo al grado de control de las variables y la forma de selección de los individuos:

Experimental

b. De acuerdo a la dirección que sigue el estudio:

Prospectivo

c. De acuerdo al número de ocasiones en los que se realiza la medición de las variables:

Longitudinal

d. De acuerdo al número de variables que se desean estudiar:

Comparativo

3.2. POBLACIÓN MUESTRAL:

2.3.2.1. POBLACIÓN: Conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 4 - 6 meses de edad ⁷¹.

2.3.2.1.2. MUESTRA: 24 Conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 4 - 6 meses de edad, de 2.5 – 3 Kg de peso ⁷².

- Serán 12 conejos para el grupo experimental (defecto con autoinjerto dentario particulado y defecto control negativo) y 12 conejos para el grupo control (defecto con plasma rico en factores de crecimiento y defecto control negativo).

Criterios de selección:

- Conejos raza Nueva Zelanda de dos diferentes camadas.
- Conejos en buen estado de salud.
- Conejos con edades comprendidas entre 4 - 6 meses.
- Conejos de 2.5 kg. a 3 kg. de peso⁷²
- Conejos que no presenten alteraciones físicas

Distribución de la Muestra:

Se dividió a la muestra en dos grupos de experimentación, donde se aplicaron dos tipos de injerto; el grupo experimental contó con: un defecto en fémur con autoinjerto dentario particulado (grupo experimental) y un defecto sin injerto (grupo control negativo); el otro grupo experimental contó con: un defecto en fémur con plasma rico en factores de crecimiento (grupo control positivo) y un defecto sin injerto (grupo control negativo).

La selección de conejos para la conformación de grupos fue de manera aleatoria.

3.3. HIPÓTESIS:

Hipótesis Verdadera:

La neoformación ósea obtenida con el autoinjerto dentario particulado es mayor a la neoformación ósea obtenida con la Plasma Rico en Factores de Crecimiento en fémur de *Oryctolagus cuniculus*.

Hipótesis Investigativa:

Existe diferencia significativa entre la neoformación ósea obtenida con el autoinjerto dentario particulado y la neoformación ósea obtenida con el Plasma Rico en Factores de Crecimiento en fémur de *Oryctolagus cuniculus*.

3.4. VARIABLES:

Tipo de Injerto (Variable independiente), Neoformación ósea (Variable Dependiente) y Tiempo (Covariable).

3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES:

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	TIPO	ESCALA	VALOR FINAL
NEOFORMACIÓN ÓSEA	Tejido óseo neoformado en el defecto.	Número de cruces obtenidas	Intensidad de neoformación ósea	Cualitativo	Nominal	+
						++
						+++

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	TIPO	ESCALA	VALOR FINAL
INJERTO	Biomaterial utilizado como relleno óseo para la regeneración ósea.	Los biomateriales utilizados como el Autoinjerto Dental Particulado (ADP), Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), y defecto sin injerto.	Autoinjerto Dental Particulado	Cualitativo	Nominal	Con injerto,
			Plasma Rico en Factores de Crecimiento			Sin injerto

CO-VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	TIPO	ESCALA	VALOR FINAL
TIEMPO	Periodo de tiempo comprendido entre la fecha de colocación del material y la fecha de sacrificio del animal.	Periodo de sacrificio de los modelos animales expresado a los 2 y 4 meses.	Ficha de recolección de datos.	Cuantitativo	De Razón	2 Meses
						4 Meses

3.6 Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos:

- **Método:** Experimental.
- **Técnica:** Microscopía, Centrifugación.
- **Instrumento:** Microscopio multicabezal, Centrífuga, Ficha de Recolección de datos (Anexo 18).

3.7. Procedimiento para recolección de datos:

3.7.1. Procedimientos:

Se realizó una prueba piloto para determinar la confiabilidad del instrumento y la forma adecuada de manipulación de los sujetos de la investigación y evaluar los periodos de observación de las variables, y capacitar y calibrar al investigador en los procedimientos a realizar.

3.7.2. Método:

El método consiste en una observación estructurada mediante microscopia de luz.

3.7.3. Manejo pre-operatorio:

a. Aclimatación de los animales

Los animales ingresaron una semana antes de la intervención quirúrgica al Bioterio de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Privada Antenor Orrego para su aclimatación al nuevo ambiente y colocados en jaulas bajo condiciones ambientales de temperatura y régimen alimentario estándar (Conejina - PURINA®). ⁷³

b. Observación regular:

Después del periodo de aclimatación, se inició con el procedimiento anestésico a cargo del veterinario, los procedimientos quirúrgicos, los cuidados post operatorios de los animales estuvieron supervisados por especialistas de la Universidad Privada Antenor Orrego (médico veterinario, técnico veterinario), en condiciones de asepsia adecuadas ⁷².

c. Pre-anestesia:

Se prepararon a los conejos retirando el agua y la comida 12 horas antes tanto en la primera intervención (corte dental para la obtención del Autoinjerto Dental Particulado), seguido de la toma de muestra de sangre para la elaboración del plasma rico en plaquetas (PRP). Se continuó con el corte y trituración de los incisivos centrales inferiores (autoinjerto dental particulado); finalmente se rellenó con los injertos, los defectos óseos realizados en el fémur de los modelos animales ^{85, 87, 88}.

d. Anestesia:

La aplicación de la anestesia fue administrada por vía Intramuscular con la administración de Ketamina (KET A-100) a dosis de 30 mg/kg de peso, el nivel de anestesia se mantuvo con Promazil a dosis de 1ml/kg de peso; para ello se utilizarán jeringas de 5 ml con aguja de 40 x 0,8 montada, estéril. Dicho procedimiento será realizado por el médico veterinario, quien cuenta con la capacitación en el manejo de animales. La inducción y el mantenimiento de la anestesia serán controlados mediante signos como la

pérdida del reflejo pupilar y la relajación del músculo esquelético de la zona quirúrgica, a cargo del médico veterinario ⁷⁵.

En la primera intervención del sujeto del grupo ADP se realizó el corte dental ⁷⁴, de inmediato se procede a la trituración con el particulador de hueso, del mismo para obtener el autoinjerto dental particulado, posteriormente se realizó la intervención de la investigación propiamente dicha en la cual se rasuró la zona a intervenir (fémur) y luego se pincela toda el área con una solución al 10 % de polividona yodada para la asepsia dérmica adecuada ⁷³.

En la primera intervención del sujeto del grupo PRP, sólo se realizó la toma de muestra de sangre para la obtención del PRP y también la obtención de membrana de PPP para cubrir el injerto, y posteriormente se ejecutó la intervención de la investigación propiamente dicha en la cual se rasuró la zona a intervenir (fémur) y luego se pincela toda el área con una solución al 10 % de polividona yodada para la asepsia dérmica adecuada ⁷³.

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en la Clínica Veterinaria Can & Fel, estando a cargo del Médico Veterinario Juan Carlos Hernández. Se realizaron doce intervenciones quirúrgicas diarias; a cargo de la investigadora estudiante del X ciclo de Estomatología, Martha Aurora López Monja, con el apoyo de los asesores especialistas: CD. Esp. Augusto Alberto Aguirre Aguilar, CD. Esp. Marco Antonio Reátegui Navarro.

3.7.4. Obtención del Plasma Rico en Factores de Crecimiento:

Anitua (1999) propone utilizar el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). En donde las plaquetas contienen algunos factores de crecimiento, como: Factor de crecimiento transformador β 1 (TGF- β 1), Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Factor de crecimiento insulínico (IGF-I) dichas proteínas tienen propiedades, como la migración celular dirigida (quimiotaxis), proliferación y diferenciación celular, todos estos acontecimientos claves en los procesos de reparación y regeneración. La técnica diseñada por él, que ha sido desarrollada por el laboratorio Biotechnology Institute (BTI), consiste en la extracción de 20 centímetros cúbicos de sangre del paciente. La cual se centrifuga para diferenciar las distintas fracciones de plasma y separar la porción más rica en factores de crecimiento.

Esta técnica consiste en:

2. La selección de las venas; metacarpianas o antecubitales y la extracción de 20 centímetros cúbicos de sangre.

2. La introducción de la sangre en tubos estériles con citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante. Se centrifuga 1,800 rpm (450 g) durante 8 minutos para separar el plasma donde se obtienen tres fracciones:

Fracción 1, corresponden a los primeros 500 μ L (0.5 cc) que se considera un plasma pobre en plaquetas y por lo tanto pobre en factores de crecimiento.

Fracción 2, corresponden a los siguientes 500 μL (0.5 cc) obteniendo un plasma con un número de plaquetas similar al que tiene la sangre periférica.

Fracción 3, los siguientes 500 μL (0.5 cc) considerando la porción del plasma más rico en plaquetas, encontrándose inmediatamente después de la serie roja.

3. Pipeteo de las muestras.

- Primero, con una pipeta de 500 μL (0.5 cc) se aspira la fracción superior (fracción 1) y se traslada a un tubo de cristal estéril, previamente etiquetado.

Repitiendo lo mismo con el tubo 2, por lo tanto ésta será la fracción de plasma más pobre en plaquetas.

- Segundo, con la pipeta de 500 μL (0.5 cc) se aspira la fracción 2 en ambos tubos y se traslada a un tubo de cristal estéril. Esta fracción de plasma (f2) contiene un número de plaquetas por unidad de volumen similar a las contenidas en la sangre periférica.

- La tercera fracción de plasma (f3) es la más importante por su alto contenido en plaquetas. Se realiza un pipeteo cuidadoso, utilizando para ello una pipeta de 100 μL (0.1 cc) con el fin de evitar turbulencias y no aspirar los hematíes. Repitiendo el pipeteado cinco veces y se lleva a un tercer tubo de cristal estéril, éste será el plasma más rico en factores de crecimiento (PRGF) (Fracción 3). Los 0.2 cc de plasma que están más

próximos a los hematíes son los que tienen el contenido más alto en plaquetas.

4. Activación y agregación de las plaquetas.

Una vez que tenemos la fracción de plasma que vamos a utilizar, realizaremos la activación del coágulo utilizando cloruro de calcio al 10% para inducir la activación plaquetaria y la exocitosis de los gránulos α . El calcio actúa como cofactor necesario para la agregación plaquetaria.¹¹ Se forma un tapón gelatinoso muy consistente y de fácil manipulación.

Cuando se activa se inicia la cascada de coagulación, con la transformación de las plaquetas se liberan los factores de crecimiento, y la coagulación del fibrinógeno por lo que se debe hacer unos 10 minutos antes de su utilización, pudiendo acortar los plazos con un baño térmico a 37 °C.

El gel obtenido de color amarillo-rosado contiene PRGF (Plasma rico en factores de crecimiento) y el de color transparente PPP (plasma pobre en plaquetas).

La preparación obtenida de PRGF puede ser combinada con un material osteoconductor, como injertos autógenos o aloinjertos, mejorando así la consistencia y el manejo del mismo.

3.7.5. Obtención del Autoinjerto Dental Particulado:

- a) Se realizó un corte horizontal en ambos incisivos inferiores, utilizando un disco de carburo, con ayuda del dremel.
- b) Después de obtener esa porción dental, se llevó al particulador de hueso, para convertirlo en pequeños bloques.
- c) Esas porciones obtenidas ya tamizadas por el particulador se colocan en el defecto óseo.

3.7.6. Intervención Quirúrgica:

Se colocaron a los animales de los dos grupos en posición de decúbito supino sobre una mesa quirúrgica, con el campo quirúrgico delimitado por toallas estériles perforadas. Todo el instrumental utilizado en la intervención quirúrgica fue esterilizado previamente.

El sitio quirúrgico elegido fue la diáfisis mesial y distal femoral izquierda; se inició con una incisión de 1 cm en la superficie distal del fémur, con una hoja de bisturí N° 15 en un mango N°3, extendiéndose hasta el periostio⁷⁶, luego se procedió al levantamiento del colgajo con una legra dejando el hueso expuesto y manteniendo el periostio intacto. Se realizó un defecto con un kit de fresas nuevas por cada intervención del día, montada en un motor eléctrico estéril (Dentoflex) para obtener los defectos óseos.

Se crearon 02 defectos óseos en cada fémur (situados a una distancia de 10 mm) de 3mm de diámetro, utilizando trefinas; para obtener la profundidad deseada. Finalizado el procedimiento quirúrgico se procedió a colocar el

material de investigación según la asignación para cubrir la entrada de los defectos; en el sujeto del primer grupo (ADP), uno de los defectos será cubierto con el material de experimentación (Autoinjerto Dental Particulado), este se obtuvo después de haberse realizado el corte al diente con el disco de carburo y con una trituradora de hueso se obtiene un injerto tipo polvo y sobre este injerto se colocó un teflón para asegurarnos una regeneración ósea guiada, el otro defecto fue para el control negativo o gold standart (no se colocará ningún injerto). En el sujeto del segundo grupo (PRGF), uno de los defectos fue cubierto con el material de experimentación (Plasma Rico en Factores de Crecimiento); este fue obtenido recolectando 4.5ml de sangre en un tubo con 1ml de citrato sódico al 3.8% (anticoagulante), luego de ello lo llevaremos a la centrifugar a 1800 rpm por 8 minutos, después de haberlo colocado en el defecto cubrimos este injerto con un teflón para asegurarnos la regeneración ósea guiada, en el otro defecto fue para el control negativo o gold standart (no se colocará ningún injerto).

Finalmente se procedió a suturar todos los planos, los más profundos y los más superficiales con hilos reabsorbibles con ácido poliglicólico (6/0 – Aguja semicircular traumática corte invertido) ⁷⁵.

3.7.7. Manejo post – operatorio:

Los conejos fueron agrupados cada uno en su jaula según su grupo de estudio, inmediatamente después de la intervención, sin movilizar la extremidad ⁷².

Cada jaula registrará el grupo de estudio, la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha de toma de muestras. Los animales se identificarán con dos letras dependiendo del biomaterial con el que fueron tratados.

De esta manera, se denominó como ADP a los animales que recibieron el autoinjerto dental particulado, y PRP los animales que recibieron Plasma Rico en Plaquetas. A lo anterior, se le agregaron dos cifras numéricas que señalaron el tiempo de tabulación y el número correlativo del ejemplar (Ej. AD-03-01).⁷² Esta denominación se mantendrá en las piezas recogidas (Fémur) para el estudio histomorfométrico.

a. Analgesia

La analgesia se efectuó con Ketoprofeno (Profenid®) en dosis de 10mg/kg de peso administrado por vía intramuscular, usando jeringas de tuberculina de 1ml. con aguja 26 G, cuya primera dosis será colocada al terminar la intervención quirúrgica y luego se administró cada 24 horas hasta completar tres días.

Se utilizó como antibiótico Quinolaba Oral 10% (Enrofloxacina), durante 5 días; además se administrará 3 gotas por día de manera directa en la boca del animal. Ambos medicamentos son indicados por el médico veterinario como parte del protocolo y administrados por el técnico veterinario ^{72, 81, 83}.

b. Controles

Todos los animales fueron controlados diariamente en los primeros 3-5 días después de la cirugía para observar señales de angustia, tales como cambios en el apetito, en la apariencia física y la protección de la extremidad afectada⁷². Las observaciones diarias estarán a cargo del técnico veterinario y el investigador.

Los animales permanecieron en sus jaulas hasta completar el periodo predeterminado (2 y 4 meses).

3.7.8. Eutanasia:

Para la recolección de muestras se empezó con la eutanasia a los conejos, administrando Pentoarbitral en una dosis de 3ml, el animal sufre un ataque cardíaco y fallece, luego se procede a la amputación del miembro donde fue realizada la intervención, en este caso el fémur derecho, se observa en el hueso la cinta teflón donde fueron realizados los defectos, se retiraron y ahí se procede a realizar cortes con un disco de carburo y esas muestras obtenidas se envían al patólogo para que las procese.

Una vez extraídas las muestras de hueso donde fue colocado el injerto y en las que no, se fueron colocados en un fijador para microscopía óptica de rutina el cual estará constituido por formol al 10% y llevado posteriormente al laboratorio de histología del departamento de Patología e Histología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Privada Antenor Orrego, para el procesado del tejido obtenido ^{72, 75}.

3.7.9. Evaluación:

Cada espécimen fue preparado para ser sometido a un estudio histomorfométrico a los 2 y 4 meses ⁷⁴.

Estudio histopatológico:

a. Obtención de las Muestras:

Todas las muestras obtenidas de tejidos se deben de procesar de una buena manera para tener unos buenos cortes histológicos para conseguir una mejor información del material a procesar.



Figura 2 Obtención de muestras

b. Proceso de fijación de muestra:

Se utiliza formaldehído para conservar la forma original del tejido.

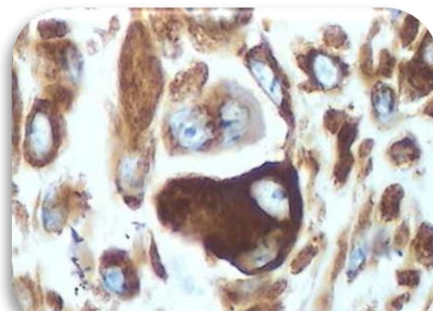


Figura 3 Fijación de muestras

c. Lavado:

Se lavó el tejido para quitar el exceso de fijador (formaldehído).

d. Deshidratación:

Se colocaron las muestras de los tejidos en alcohol etílico de concentraciones crecientes según se indica:

- El primer paso consistió en colocar las muestras de tejido en etanol al 70% 2 veces por 1 minuto cada uno.

- Segundo paso, se colocó etanol al 80% 2 veces por 1 minuto cada uno.

- Tercer paso, se colocó etanol al 96% 2 veces por 1 minuto cada uno.

- Cuarto paso, se colocó etanol al 100% 2 veces por 1 minuto cada uno.

- Por último, en el quinto paso, se colocó xileno 2 veces por 3 minutos cada uno.



Figura 4 Deshidratación

e. Aclaramiento:

En este paso se utiliza un disolvente de parafina, el más usado es el xilol que actúa sobre las muestras deshidratadas penetrando lo más profundo de los tejidos. Después se coloca las muestras de tejido en xileno realizando dos cambios cada hora.

f. Infiltración

En este paso se coloca la muestra en una parafina líquida para eliminar el xilol. Después la deshidratación, el aclaramiento y la infiltración se realiza con un procesador de tejidos en este caso se utiliza Autotecnicon o de manera manual.

Colocamos las muestras de tejido en parafina y realizamos 2 cambios por una hora cada uno.

g. Inclusión:

Aquí se tienen que formar bloques de parafina con las muestras de tejido a estudiar. Posterior a la inclusión y secado. Se deja enfriar en el congelador para después poder hacer los cortes.

- Se funde la parafina sobre una platina con mechero y estufa volviéndola líquida.

- La muestra se lleva al recipiente que contiene la parafina líquida con una temperatura constante entre 50 °C a 56°C, para iniciar la infiltración.

- La muestra pasa por dos baños de parafina líquida, esto se hace en recipientes separados.
- Se saca la última parafina líquida se lleva a un recipiente para formar el bloque, para realizar la inclusión definitiva.
- La muestra se sumergió en parafina, bien orientada, centrada y se identificó; se le fue colocando parafina líquida hasta llenar la caja y se llevó al refrigerador por 15 minutos.
- Se desmoldó el material solidificado y se llevó al micrótopo el bloque así formado y previamente tallado en forma de pirámide truncada, para ajustarlo al portabloque y se procedió al siguiente paso de la técnica histológica.



Figura 5 Inclusión

h. Microtomía:

Se realizaron cortes histológicos según los siguientes pasos:

- Antes de cortar un bloque hay que examinarlo y saber cómo va a ser orientado en el portabloque.
- Remover el exceso de parafina de los lados.

- Colocar el bloque en el porta bloque.
- Ajuste preciso con los tornillos del porta bloque.
- Orientar y ajustar con los tornillos de direccionamiento (laterales y verticales) hasta que el bloque quede completamente paralelo al porta cuchilla.
- Colocar la cuchilla.
- Proceder a tomar rebanadas gruesas hasta visualizar por completo el tejido (10 a 15 micras).
- Una vez que la superficie tisular entera este expuesta reajustar a 4 micras.
- Tomar el corte con agujas histológicas y colocarlo en gradillas a la estufa de 37° en una lámina portaobjetos que previamente se pasó por un preparado de albúmina (batido de huevo y glicerina, de proporciones iguales) y se deja la lámina en la estufa por 20 minutos.



Figura 6 Procesador Automático

i. Confección del Taco:

Obtención del bloque de parafina de forma regular, para ser cortado con el micrótom.

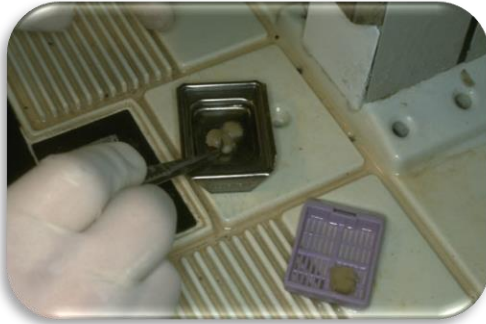


Figura 7 Confección del taco

j. Corte:

- Micrótom Rotativo.
- Micrótom de Deslizamiento.
- Micrótom de Congelación.
- Crióstato.



Figura 8 Micrótom Rotativo

k. Extensión:

1. Utilizar portaobjetos limpios y preparados con el adhesivo adecuado.
2. Se realiza en agua tibia (38 °C).
3. Precaución: el preparado debe quedar bien extendido y sin pliegues.
4. Rotular.

5. Luego de escurrir el exceso de agua llevar a estufa (60 °C) no más de dos horas.

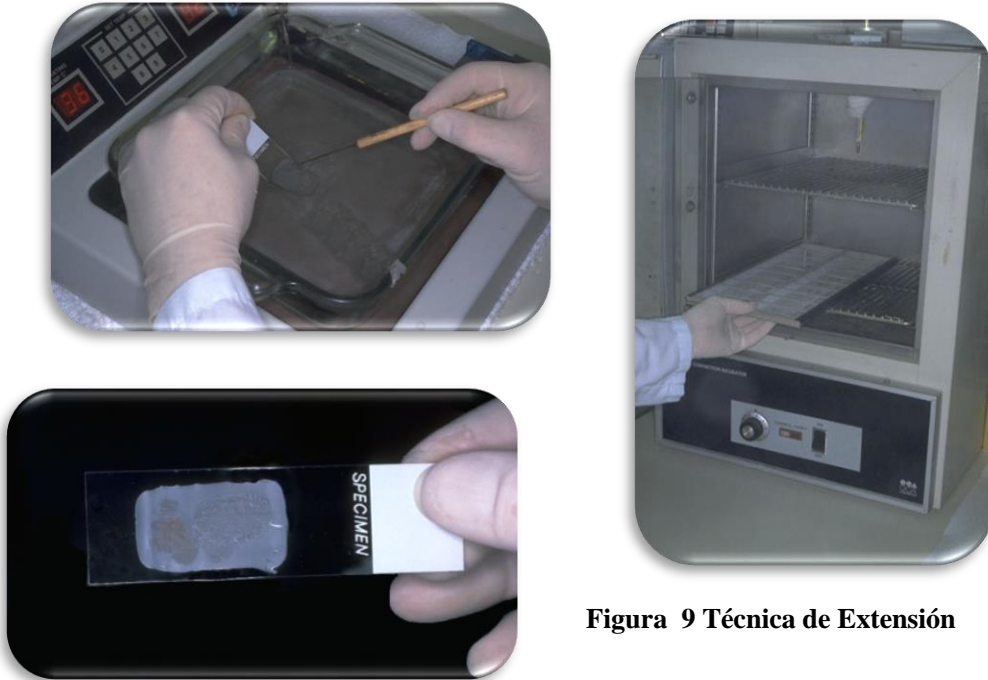


Figura 9 Técnica de Extensión

I. Desparafinado y coloración

Antes de proceder a realizar la coloración, los cortes de tejidos se encontraron embebidos en parafina solidificada, adosados a las láminas portaobjetos gracias a la utilización de albúmina. En cuanto a la coloración, se empleó la hematoxilina y eosina (H&E), los cuales tiñen sustancias ácidas y básicas respectivamente; en tanto, para que los colorantes Hematoxilina (disuelto en solución acuosa) y Eosina (disuelto en solución alcohólica) puedan penetrar en los tejidos, el corte fue desparafinado, para ello las láminas se sometieron al siguiente procedimiento (cada paso en recipientes distintos):

- En xilol por 10 minutos, luego se repite en otro frasco que contenga xilol por 10 minutos nuevamente y por último se repite en otro frasco que contenga xilol por 10 minutos más.
- En alcohol absoluto 100 % enjuagar por 1 a 2 minutos, y se repite nuevamente en otro frasco con alcohol al 100 %.
- En alcohol al 96 % enjuagar por 1 a 2 minutos, luego se repite en otro frasco que contenga alcohol 96 % por 1 a 2 minutos.
- En alcohol al 80 % enjuagar por 1 a 2 minutos, luego se repite en otro frasco que contenga alcohol 80 % por 1 a 2 minutos.
- En agua corriente enjuagar por 1 a 2 minutos.
- En hematoxilina 3 minutos hasta 5 minutos máximo.
- En agua corriente enjuagar por 1 a 2 minutos.
- En alcohol ácido solo una entrada y salida.
- Rápidamente se enjuaga en agua corriente.
- En amoníaco solo una entrada y salida es solo para darle mejor color.
- En agua corriente se enjuaga por 5 – 10 minutos.
- En eosina 3 minutos hasta 5 minutos máximo.
- En alcohol al 80% enjuagar por 1 a 2 minutos, luego se repite en otro frasco que contenga alcohol 80 % por 1 a 2 minutos.

- En alcohol al 96 % enjuagar por 1 a 2 minutos, luego se repite en otro frasco que contenga alcohol 96 % por 1 a 2 minutos.
- En alcohol al 100 % enjuagar por 1 a 2 minutos, luego se repite en otro frasco que contenga alcohol 100 % por 1 a 2 minutos
- En xilol por 10 minutos, luego se repite en otro frasco que contenga xilol por 10 minutos nuevamente y por último se repite en otro frasco que contenga xilol por 10 minutos más.

Coloración con Hematoxilina Coloración con Eosina Coloración con Hematoxilina - Eosina

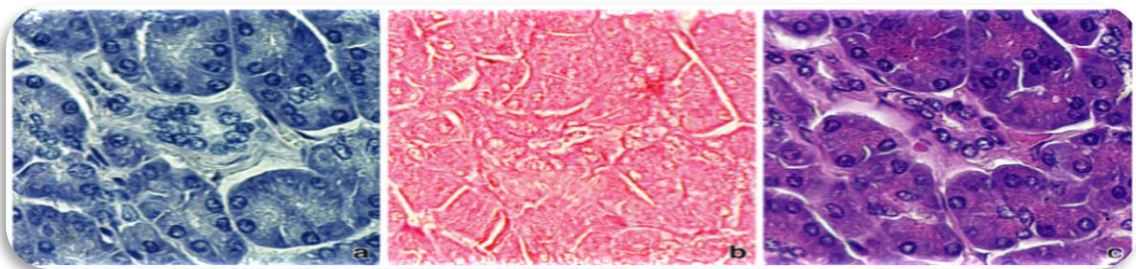


Figura 10 Tipos de coloraciones

i. Montaje

Cuando se extrae el porta-objetos del último baño con xilol (baño de aclaramiento), se colocó una gota de bálsamo Martex, sobre un extremo del corte y se dejó caer suavemente la laminilla cubre-objetos, limpiando luego cualquier exceso, al endurecer el bálsamo, la lámina porta-objetos quedó protegida con la laminilla cubre-objetos y se procedió a observar con el microscopio.

j. Lectura

Por microscopía óptica se realizó la lectura de los cortes para identificar las estructuras anatómicas de los componentes del aparato reproductor. Posteriormente, se procedió a fotografiar los hallazgos histológicos en las láminas montadas

El corte de las muestras fue realizado en sentido horizontal a nivel de los dos defectos (tanto el relleno con injerto como el control). Dicho procedimiento fue realizado por un especialista en patología, el Mg. César Lombardi Pérez, con experiencia en la realización de estudios histomorfométricos en diversas especies de animales (Ver Anexo 17).

Las muestras fueron analizadas en un microscopio de luz multicabezal y siguiendo el protocolo de medición histomorfométrica por conteo de puntos utilizando el criterio de neoformación de matriz ósea y solocromo cianina R (solución acuosa al 1%) para tinción.

Las secciones histológicas observadas colocando en el lente ocular del microscopio un disco micrométrico con una gradilla de 24mm de 10mm/100 cuadrados, que nos ayudará a estimar la fracción de volumen de los componentes de la reparación alveolar por el método de conteo diferencial de puntos⁹².

3.8. Plan de Análisis estadístico de datos:

3.8.1. Plan de análisis:

Los datos se procesaron en el programa estadístico SPSS versión 23.0, se fijó un nivel de significancia del 5 % (0.05) que corresponde a un intervalo de confianza del 95 % (0.95).

- **Estadística descriptiva:**

Las variable neoformación ósea será analizada teniendo en cuenta la media aritmética y desviación estándar.

- **Estadística analítica:**

En la estadística analítica se realizarán las pruebas de normalidad; la Prueba utilizada fue la de Shapiro-Wilk en la cual se aceptó que las variables tenían distribución normal cuando $p > 0,05$. Posteriormente, se realizó la prueba exacta de Fisher para muestras independientes para comparar la neoformación ósea obtenida con Autoinjerto Dental Particulado, Plasma Rico en Factores de Crecimiento, Defecto sin relleno óseo y sus respectivos controles; afrontando dos subgrupos diferentes.

3.8.2. Criterios éticos:

El presente trabajo de investigación se realizó teniendo en cuenta el reglamento para el derecho de los animales y las consideraciones para el trabajo con los animales de laboratorio de la UNESCO; así como, siguiendo las normas establecidas por el Comité Institucional de Ética de Animales de

la Universidad Privada Antenor Orrego para el trabajo y cuidado de los animales de experimentación.

Principios Generales para el Cuidado Animal:

Todas las actividades que utilicen animales para la investigación, diagnóstico, control de calidad y producción de biológicos deberán tener en cuenta los siguientes principios:

-Posibilitar solamente el mínimo de manipulaciones al animal y las intervenciones en su entorno, evitando perturbarlo o provocarle reacciones de alerta, refugio o escape.

-Deberá evitarse el dolor o sufrimiento que puede ser experimentado por los animales, o mimetizado en la mayor medida posible, con asesoramiento veterinario para el uso de sedación, anestesia apropiada, analgesia y otra medida aplicable al tipo de animal y estudio.

-Aquellos que utilicen o cuiden animales deben ser calificados y competentes para ello, por ambos motivos, por su propia seguridad y por la salud y bienestar de los animales.

-Ofrecer un entorno saludable.

-Lograr la seguridad del confinamiento evitando escapes o la penetración de otros animales.

-En caso necesario, se deberá aplicar la eutanasia a los animales lo más temprano posible, coherente con los objetivos científicos del estudio.

Animales aceptados para la experimentación según el Instituto Nacional de Salud⁹⁴:

-Animales mayores (equinos, ovinos y caprinos).

-Animales Menores (conejos, cuyes, gansos, ratas, ratones, hamsters).

En el informe se debe incluir el propósito de uso, número de animales utilizados en semestre, duración de la experimentación, logros o resultados, responsables.

3.8.1. Ventajas y desventajas de su uso como animal de laboratorio

Ventajas

- Es de fácil cuidado y mantenimiento;
- Su reproducción es muy rápida;
- Su alimentación es sencilla por sus hábitos alimenticios;
- Su costo es bajo;
- Posee grandes vasos en la oreja;
- Tiene calidad y cantidad de anticuerpos.

Desventajas

- Sufren una gran variedad de enfermedades y reacciones extremadamente variables a la mayoría de anestésicos generales.

3.8.2. Barrera sanitaria

Son instalaciones físicas que separan una zona limpia de una zona sucia o de un lugar menos limpio de otra más limpia; por ejemplo esclusas, vestidores o presión diferencial de aire; propios de la infraestructura y diseño del local ⁸¹.

3.8.3. Obtención del animal

La obtención del animal de laboratorio como un modelo, se basa en requerimientos mínimos como:

- 1) Calidad genética y ambiental adecuada (microorganismos, climáticos, físico-químicos, habitacional, nutricional) según el experimento;
- 2) Situación experimental;
- 3) Principios éticos: evitar sufrimiento innecesario.

3.8.4. Certificado de sanidad

Documento que acredita la calidad sanitaria de los animales, producidos o adquiridos, mediante estudios adecuados que certifiquen la ausencia de enfermedades que puedan interferir con los resultados experimentales.

Todos los animales adquiridos por compra, donación y que serán utilizados como animal de laboratorio, deben ir acompañados del documento que certifique las condiciones de salud y calidad en que se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de su salida del lugar de origen.

3.8.5. Personal

El personal que va a estar relacionado con el manejo y cuidado de los conejos como animales de laboratorio tienen que tener el criterio básico de trato humanitario hacia estos animales^{82,84}.

3.8.6. Capacitación

Se deberá tener programas de capacitación continua con respecto a:

- Cuidado y manejo de animales de laboratorio;
- Limpieza y sanitización de ambientes y materiales;
- Crianza animal;
- Salud y seguridad ocupacional, deberá conocer los peligros microbiológicos y físicos al que se expone el personal;
- Manejo de materiales de desecho;
- Zoonosis.

Por lo tanto, el personal bien entrenado y motivado puede asegurar la calidad en el cuidado y manejo de los animales ^{85, 86}.

3.8.7. Normas de seguridad y protección

Para brindarle buenas condiciones de mantenimiento y salud a los conejos es necesario que el personal adopte normas y formas de trabajo, para ello, deberá contar con procedimientos normalizados por escrito como:

- Higiene de personal;
- Ingreso a las áreas;

- Uso de la vestimenta y protección personal;
- Procedimientos de limpieza de ambientes, con programas de limpieza y rotación de desinfectantes efectivo;
- Procedimiento de eliminación de desechos;
- Programa de control de plagas;
- Contar con un programa de seguridad ocupacional.

Entre las normas de higiene y de seguridad más importantes para el personal que manipula a los conejos tenemos:

- Se debe trabajar con el menor ruido posible, para reducir el estrés ocasionado a los animales;
- Conocer la localización del botiquín de primeros auxilios;
- Utilizar guantes quirúrgicos para el manejo de los animales;
- No llevar nada a la boca mientras se esté trabajando con los conejos;
- Rotular e identificar las jaulas

3.8.8. Seguridad e identificación de peligros

El personal tiene que identificar y evaluar los peligros y riesgos que son propios cuando se maneja y usa animales de experimentación como conejos, entre ellos los rasguños, mordidas, peligros microbiológicos y peligros químicos de los agentes de limpieza, alérgenos y zoonosis, así como el manejo de los materiales de desecho ⁸⁹.

3.8.9. Evaluación médica

El personal que esté en contacto con los animales, deberá tener evaluaciones médicas periódicas. Se deberá adoptar un plan de inmunización apropiado contra el tétano, rabia y hepatitis-B.

3.8.10. Microambiente

El microambiente, es el ambiente físico inmediato que está en contacto directo con el conejo, también llamado encierro primario, lo conforman la jaula, el agua de bebida y el alimento ^{81,82}.

3.8.10.1. Caja o jaula y tipo de material

Se debe considerar los siguientes aspectos de la jaula:

- De fácil limpieza y manipulación;
- Que brinde protección al animal;
- Evitar la humedad;
- Que permita la libre y adecuada circulación de aire e iluminación;
- Con acceso fácil a la comida y el agua^{85,88}.

Jaula para la hembra:

Se recomienda que la jaula para la hembra sea de 1 m de largo por 60 cm de ancho y 50 cm de altura. Dentro de ella debe existir un nido de 30 cm de ancho, por 38 a 40 cm de largo, por 25 cm de alto y tener una puerta aparte, pero estos son caros y difíciles de limpiar, por lo que se recomienda

nidos descartables. Cuando se crían en cajas de madera con piso de paja no es necesario colocar nidos ⁸¹.

Jaula para el macho:

El macho requiere una jaula de 80 cm de largo por 60 cm de ancho y 50 cm de altura. Se prefiere que el piso de la jaula sea de alambre tejido para evitar la humedad. Cuando se usa cajas de madera se utilizan bandejas de aluminio⁸⁴.

3.8.11. Densidad animal

Lo mismo que cualquier otro animal, el conejo debe disponer de un área de alojamiento apropiada a su tamaño y peso.

Es conveniente que los conejos se críen en jaulas individuales por las siguientes razones:

- Mayor control de su reproducción:
- Mejor control sanitario (limpieza, desinfección y menores riesgos de contagio);
- Es necesario tener claro que la densidad animal está relacionada directamente con la disposición de espacio ^{85, 87, 88}.

Tabla Densidad del Animal⁸⁴

ESPECIE	PESO CORPORAL kg	Área mínima de piso/animal cm ²	Altura mínima de la jaula (cm)
Conejo	Hasta 2	2000	40
	Hasta 4	4000	45
	Hasta 6	5400	45
	Mayor de 6	6000	45
	Coneja en lactancia	2000 adicional	45

En ocasiones, los conejos que han alcanzado la pubertad resultan sumamente agresivos, de tal forma que, de alojarse juntos los machos, pueden llegar a castrarse unos a los otros. En cuanto a las hembras, y al margen de las lesiones que pudieran infligirse, el agrupamiento homosexual puede producir pseudogestación, en consecuencia y a partir de los tres meses de edad, es muy aconsejable alojar a los animales en jaulas individuales ⁸⁷.

3.8.12. Agua de bebida

El agua para los conejos debe ser clara y potabilizada. No se deben permitir que los bebederos acumulen algas por lo que debe ser cambiada diariamente. Lo ideal es usar sistemas automáticos de abastecimiento de agua y tolvas automáticas.

Para la desinfección del agua se recomienda el uso del hipoclorito de sodio en cantidad de 6 ml en 100L de agua.

Está de más decir que los bebederos pueden ser de diferentes materiales y formas, pero siempre con la higiene apropiada⁸².

3.8.13. Alimento: variedades de dieta y requerimientos

La alimentación requiere de proteínas, energía, fibra, minerales, vitaminas y agua en niveles que dependan del estado fisiológico, la edad y el medio ambiente donde se crían. En cuanto a grasas, estas son fuentes de calor y energía y la carencia de ellas produce retardo de crecimiento y enfermedades como dermatitis, úlcera en la piel y anemias ⁸⁷.

Los principales minerales que deben estar presentes en las dietas son: calcio, fósforo, magnesio y potasio; el desbalance en la dieta de uno de estos produce crecimiento lento, rigidez en las articulaciones y alta mortalidad. La relación de fósforo y calcio en la dieta debe ser de 1 a 2.

La vitamina limitante en los conejos es la vitamina C, por ello es conveniente agregar un poco de esta vitamina en el agua de bebida (0,2 g/L de agua pura) ⁸⁵.

El conejo es herbívoro (forraje fresco o forraje seco), pero se puede alimentar usando alimento balanceado de calidad, en forma de *pellets*, que contenga entre 17 a 20% de proteínas o con alimentos naturales como granos de cereales, heno, soya, pasto fresco y verduras, o también de una alimentación mixta, pero este sistema es mayormente empleado en crianzas con fines netamente comerciales para venta de carne.

3.8.14. Macroambiente

Es el espacio inmediato al microambiente es decir la sala de alojamiento en su ámbito general.

Las habitaciones o salas grandes como para criar entre 200 a 300 animales ofrece ciertas ventajas, pero es muy difícil el control de las enfermedades. Las habitaciones o salas más pequeñas permiten separar a los animales en clases. Lo ideal son cuartos para alojar entre 50 a 60 animales ^{87,89}.

3.8.15. Aire y ventilación

Es muy importante una buena ventilación; se recomienda entre 15 a 20 cambios por hora como mínimo. Cuando hay una buena rutina de limpieza y la densidad animal es baja, se puede bajar la velocidad de ventilación.

Es necesario tomar en cuenta las posibles cargas térmicas, el tamaño y número de animales; el tipo de lecho o la frecuencia de su cambio; las dimensiones del cuarto y la eficiencia de la distribución del aire ⁸⁸.

3.8.16. Temperatura

Aunque toleran grandes fluctuaciones térmicas, entre 10 y 26 °C, es recomendable un rango de 18 a 22 °C.

3.8.16. Humedad

Se recomienda entre 40 a 70% de humedad relativa.

3.8.17. Intensidad de luz y tipo de iluminación

En la actualidad, no existen datos basados en estudios científicos sobre la repercusión de diversos niveles de intensidades de luz en especies de

animales de laboratorio en general, específicamente para los conejos se ha podido comprobar que los resultados ideales se obtienen con 14 a 16 h (15 h promedio) de luz diaria ^{83, 86}.

Si se habla de la intensidad de luz lo más recomendado es utilizar un flujo luminoso de 3W/m².

En las últimas tendencias de iluminación está basadas en que los machos cuando están expuestos a una prolongada iluminación reduce su fecundidad, su cantidad de esperma y su número de saltos.

En cuanto a la hembra, y dependiendo de ritmo reproductivo, lo ideal es brindarle 16 h de luz diarias, esta es una de las razones por la cual convendría mantener separados los machos de las hembras si así se diera el caso, recalcando nuevamente que esto va a depender del ritmo reproductivo a utilizar.

3.8.18. Ruido

Se debe de evitar el ruido porque interfiere en la copulación, si existe ruido se recomienda que sea menor de 60 decibeles.

La separación de las áreas de ocupación humana y animal reduce al mínimo las molestias a ambos ocupantes de las instalaciones^{81,86}.

3.8.19. Olor:

El olor va en relación a diferentes factores como la acumulación de olores por poca ventilación, el mal uso de los desinfectantes, uso de fragancias

por parte del personal; el primer caso es factor que predispone al animal a afecciones respiratorias como pasteurelisis mientras que en el segundo caso pueden predisponer a alteraciones digestivas y respiratorias^{82,86}.

3.8.20. Cuarentena

Es el periodo de aislamiento al que se someten los animales de laboratorio y se realiza cuando se adquiere especies nuevas y con el propósito de asegurar que se encuentren en buen estado de salud, para recién llevarlos a las salas de alojamiento⁸⁷.

3.8.21. Provisión de alimentación y manejo del alimento

El conejo es un animal que no exige en la comida ya que se puede adaptar con facilidad al tipo de alimento que se de según el ambiente donde se encuentra.

La provisión de alimento debe efectuarse al menos dos veces al día (30-40% del consumo en la mañana y 60-70% en la tarde).

El alimento balanceado es completo para los conejos, viene en forma de pastillas o pellets, éstos deben de almacenarse en un lugar fresco y seco ya que de otra manera se pueden humedecer y aparecen hongos que son nocivos para estos animales, no consumirse después de la fecha de vencimiento.

El forraje fresco es un aporte importante de vitaminas y que además incentiva la producción de leche a las madres.



Figura 11 Dispensador de alimentos de conejos⁸⁵

Al momento de dar el alimento para los animales de experimentación, hay que tener en cuenta la prevención del ingreso de microbios a través del forraje, debido a que el aparato digestivo del conejo es muy sensible. Por este motivo es necesario siempre cambiar el forraje fresco para el aporte natural de vitaminas^{85,86}.

El forraje seco también es una buena opción en la alimentación ya que es un alimento altamente nutritivo, pero se debe tener mucho cuidado al calcular bien el aporte nutritivo en la ración diaria, ya que le puede ocasionar al conejo cálculos renales.

Tabla Consumo apropiado de alimento balanceado⁸⁵

	Machos	180gr
	Hembras	200gr
	Coneja gestante	350-400 gr
	Coneja en lactancia	250-300 gr ⁽¹⁾
	Gazapos destetados y hasta los dos meses	No más de 100 gr ⁽²⁾
	Gazapo mayor de dos meses	150 – 200 gr

(1) Dependiendo del número de crías.

(2) Depende del tipo de raza.

3.8.22. Provisión de agua

El agua se les debe de dar en la mañana, o al final de la tarde. Esta agua debe de ser fresca y sin contaminación. Es importante saber qué características y cualidades debe de tener el agua como se detalla en la siguiente tabla:

PARÁMETROS	VALORES ACEPTADOS	OBSERVACION
1) Dureza	< 200mg CaCO ₃ /mL	> 200 mg CaCO ₃ /mL : agua dura < 8 : agua agresiva
2) pH	6,5 a 7	< 6 : ácida ⁽¹⁾ >7 : básica ⁽²⁾
3) Nitratos	< 50 mg/L	> 50 mg/L ⁽³⁾
4) Nitritos	< 0,1 mg/L	> 0,1 mg/L ⁽⁴⁾
5) Hierro	< 0,2 mg/L	> 0,2 mg/L ⁽⁵⁾
6) Coliformes	Ausente	Presente ⁽⁶⁾

- (1) Puede captar metales a su paso por el circuito, facilitándose la precipitación de los medicamentos, predispone además los trastornos digestivos y la corrosión de los materiales.
 (2) Facilita las deposiciones o incrustaciones de diversos materiales en los conductos del agua de bebida (bebederos automáticos), y disminuye la solubilidad de las tetraciclinas, además de contribuir con problemas digestivos.
 (3) Problemas crónicos, evidentes en los gazapos, tales como la disminución del crecimiento, mortalidad y en los adultos, problemas reproductivos.
 (4) Contaminación del agua por materia orgánica en descomposición. Predispone a la presentación de problemas nerviosos de etiología desconocida, así también contribuye a la presentación de problemas cardiovasculares y respiratorios.
 (5) Se presentan problemas de corrosiones, en el caso se proteja mediante inmunizaciones al plantel este nivel de hierro puede inhibir el efecto de las vacunas vivas administradas al agua.
 (6) No apta para consumo humano, indicativo de contaminación fecal.

Tabla Características y cualidades del agua⁸⁵

Semanas de edad	Días de edad	En verano mL/día	Resto del año mL/día
5	29-35	90-105	80 - 90
6	36-42	125-140	110-120
7	43-49	170-190	150-160
8	50-56	220-240	190-200
9	57-63	260-280	210-220
10	64-70	290-310	230-240
11	71-77	320-340	250-260

Tabla Consumo de agua recomendado según las etapas de desarrollo⁸⁵

3.8.23. Limpieza y sanitización de áreas

La desinfección y limpieza debe de ser constante. Los desinfectantes elegidos no deben de tener un fuerte olor. El hipoclorito de sodio al 5,25% conocido como lejía debe de utilizarse en concentraciones mínimas.

Se deben evitar los fenoles, son eficaces, pero tienen fuerte olor y son dañinos para la salud.

Cuando se desea preparar desinfectantes se deben de seguir las instrucciones del envase y no hacer mezclas ya que algunos productos juntos se contrarrestan y no potencian su acción. Evitar también utilizar desodorantes ambientales.

Se recomienda realizar, por lo menos una vez al mes, la limpieza empleando detergente para la superficie del piso, ya que este remueve y desprende toda grasa que impide la acción del desinfectante ^{86,87,88}.

3.8.24. Limpieza y desinfección de materiales

Los parásitos y bacterias son muy pequeños, aún más los virus, éstos proliferan al no existir una adecuada limpieza, y en la mayoría de los casos son la principal causa de las enfermedades de los conejos, para evitar este suceso se recomienda una adecuada limpieza y desinfección.

Los nidos deben de estar siempre limpios y si es posible esterilizados antes de volverse a utilizar.

Los comederos y bebederos siempre deben de estar limpios, esta desinfección se realiza como mínimo una vez a la semana, con hipoclorito

de sodio al 2%. La jaula debe desinfectarse una vez al mes, siendo de preferencia después del destete^{83,84}.

3.8.25. Eliminación de desechos

La eliminación de desechos debe de realizarse con bolsas y colocados fuera de las instalaciones en contenedores cerrados, para evitar infecciones. De lo contrario se pueden realizar contratos con empresas que se encargan de la disposición final de los desechos⁸².

3.8.26. Cuidado médico veterinario y control sanitario

Al estar los conejos sanos comen y beben regularmente, están activos y son traviosos, su pelaje es limpio y sano, sus narices y ojos están limpios, sin suciedad. Su temperatura normal en recto es entre 38 y 38,5°C, su respiración es silenciosa y con 40 a 65 movimientos por minuto, su ano limpio, sin diarrea; los adultos deben de mantener su peso al contrario de los gazapos que éstos lo van ganando.

Las enfermedades más comunes y contagiosas en estos animales son:

- La pasteurelosis;
- La mixomatosis;
- La enteritis;
- Enterotoxemia;
- La salmonelosis;
- La colibacilosis;

- El estreñimiento;
- La mastitis;
- La dermatitis, etc., entre otras. ^{87,88}.

Los animales deben siempre de estar siendo observados por una persona capacitada para reconocer algún síntoma o signo de enfermedades, lesiones o de conductas fuera de lo normal.

Esto debe de hacerse una vez al día, y más aún durante alguna recuperación postoperatoria o presentan alguna enfermedad.

La limpieza es muy importante y una medida preventiva sanitaria para cualquier animal, pero en el caso de los conejos como sujeto de estudio el prevenir va a ser una acción a tomar de mayor importancia por el riesgo que se transmitan enfermedades^{84,85}.

Siempre se recomienda vacunar a los ejemplares contra la virosis, además de realizar consultas con los veterinarios especialistas.

3.8.27. Sujeción del conejo:

El operador debe de realizar la sujeción del conejo con la mano derecha, suspendiendo la piel floja del dorso y nuca del conejo, y utilizando la mano izquierda para sujetar debajo de los muslos, sentándolo sobre la palma de la mano, para que de esta manera se pueda sostener mejor el peso del animal⁸².

3.8.28. Transporte

El transporte de estos animales debe de hacerse con movimientos lentos, sin mucho ruido, siempre se debe de coger al conejo para su transporte para evitar que se originen heridas, porque si esto sucede el animal se rasguñará o morderá.

3.8.29. Sujeción en traslado hacia la jaula:

El operador sujeta al conejo colocando el antebrazo, presionando de esta manera el dorso y luego de abrazar al animal por la parte posterior de su cuerpo de esta manera el animal queda prensado entre el brazo y cuerpo del operador.

En trayectos muy largos donde se demanda más tiempo se aconseja el uso de jaulas, cestos o cajas. Es importante recordar que las orejas del conejo son sumamente sensibles y hay que evitar sujetarlos de esa parte.

3.8.3. Criterios de Rigor Científico:

En el presente proyecto de investigación se respetarán los derechos de autor citados, además se presentarán datos y resultados que serán fiables y válidos, ya que se realizarán con protocolos establecidos y validados internacionalmente ^{7, 65, 66, 67}, como resultado este podrá ser aplicado por otros estudios cumpliendo así con los criterios de transferibilidad.

3.8.4. Resultados:

Tabla 1

Comparación histopatológica de la neoformación ósea entre el autoinjerto dental particulado y el plasma rico en factores de crecimiento utilizados como relleno en fémur de *Oryctolagus cuniculus*.

Tiempo	Neoformación ósea	PRGF		ADP		Total	p*
		n	%	n	%		
2 Meses	++	4	66.7	1	16.7	5	0.242
	+++	2	33.3	5	83.3	7	
4 Meses	++	5	83.3	1	16.7	6	0.080
	+++	1	16.7	5	83.3	6	

*Prueba exacta de Fisher

En la neoformación ósea de tres cruces (Más de 60 osteocitos por campo), a los 2 y 4 meses, el autoinjerto dental particulado supera numéricamente al Plasma rico en Factores de crecimiento, particularmente a los 4 meses. Sin embargo, esta diferencia numérica no se expresa en una diferencia estadística $p > 0.05$ ($p = 0.2$ y 0.08 , a los 2 y 4 meses respectivamente).

Gráfico 1

Comparación histopatológica de la neoformación ósea entre el autoinjerto dental particulado y el plasma rico en factores de crecimiento utilizados como relleno en fémur de *Oryctolagus cuniculus*.

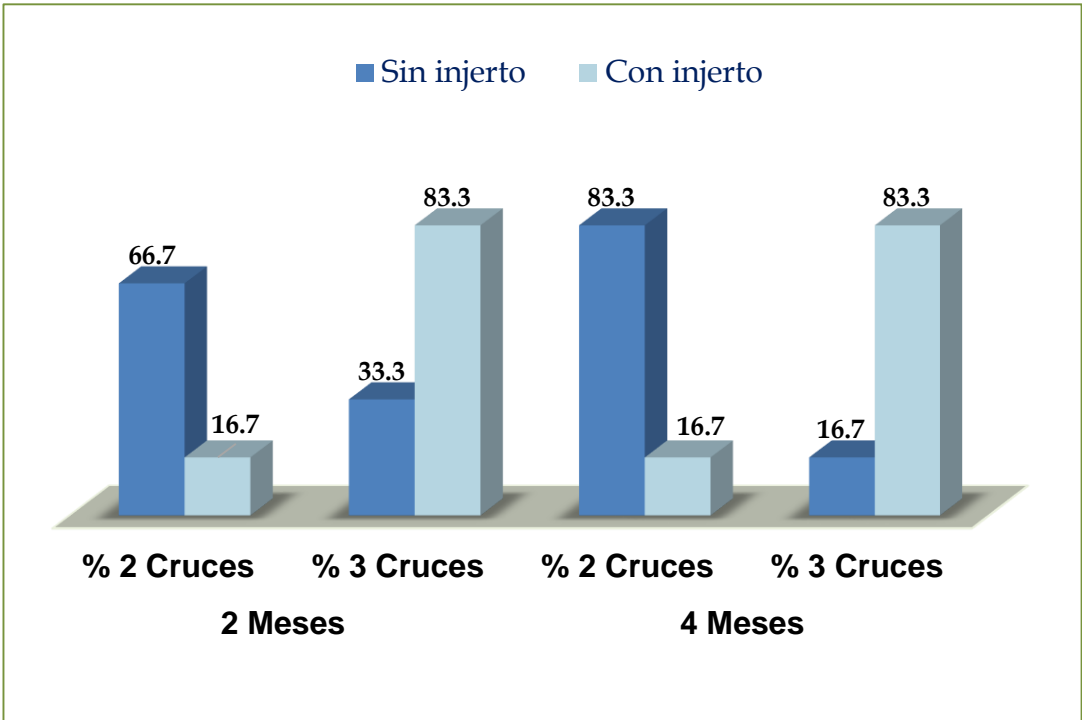


Tabla 2

Evaluación histopatológica de la neoformación ósea del autoinjerto dentario particulado, según tiempo.

Neoformación ósea	2 Meses		4 Meses		Total	p*
	n	%	n	%		
++	1	16.7	1	16.7	2	0.999
+++	5	83.3	5	83.3	10	0.999
Todos	6	100.0	6	1000.0	12	-

*Prueba exacta de Fisher

El Autoinjerto dental particulado (ADP) a los 2 y 4 meses presenta 16.7% de neoformación ósea de 2 cruces y un 83.3% de 3 cruces. Sin embargo, no hay diferencia estadística en la neoformación ósea medida en ambos tiempos (a los 2 y 4 meses $p=0.9$). (Prueba exacta de Fisher con significancia del 5%).

Gráfico 2:

Evaluación histopatológica de la neoformación ósea del autoinjerto dentario

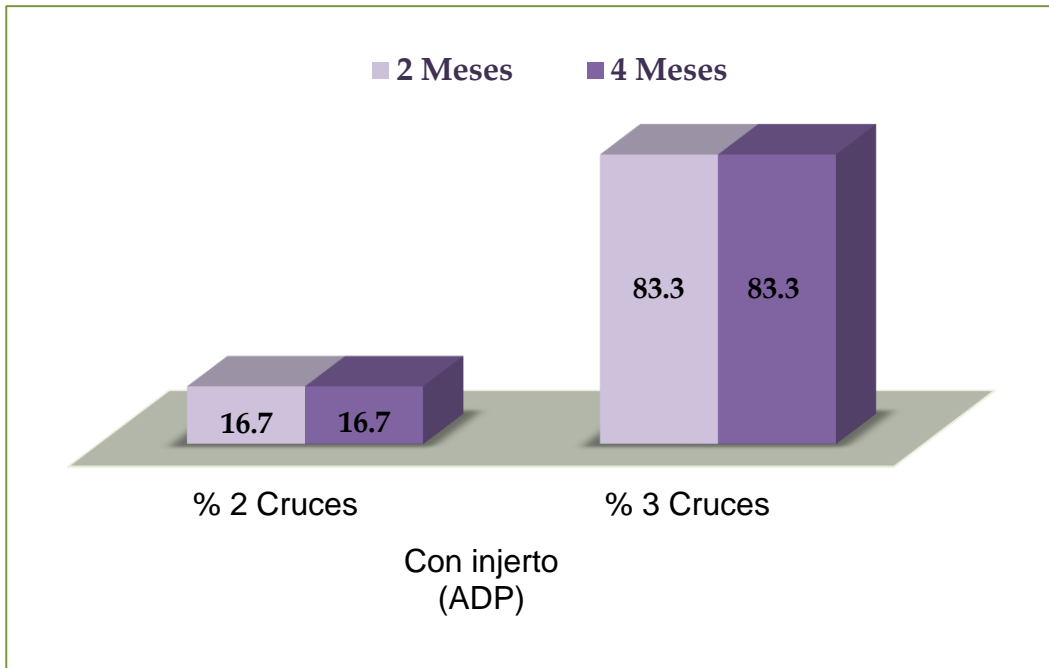


Tabla 3

Evaluación histopatológica de la neoformación ósea del plasma rico en factores de crecimiento, según tiempo.

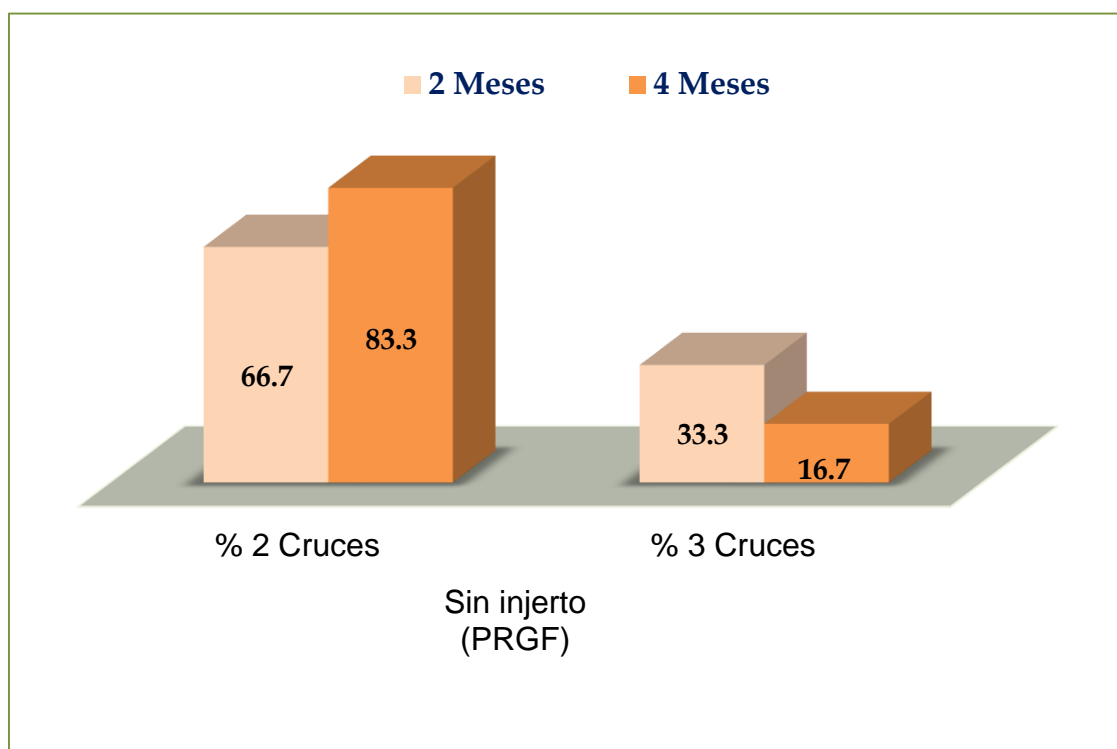
Neoformación ósea	2 Meses		4 Meses		Total	p*
	n	%	n	%		
++	4	66.7	5	83.3	9	0.999
+++	2	33.3	1	16.7	3	0.999
Todos	6	100.0	6	1000.0	12	-

*Prueba exacta de Fisher

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) a los 2 meses presenta 66.7% de neoformación ósea de 2 cruces y un 33.3% de neoformación ósea de 3 cruces, por otro lado, a los 4 meses presenta 83.3% de neoformación ósea de 2 cruces y un 16.7% de neoformación ósea de 3 cruces. Sin embargo, no hay diferencia estadística en la neoformación ósea medida en ambos tiempos (a los 2 y 4 meses $p=0.9$). (Prueba exacta de Fisher con significancia del 5%).

Gráfico 3

Evaluación histopatológica de la neoformación ósea del plasma rico en factores de crecimiento, según tiempo.



Análisis estadístico de la información

Los datos recolectados fueron procesados de manera automatizada en el programa estadístico SPSS Statistics 22.0 (IBM, Armonk, NY, USA), para luego presentar los resultados en tablas de y/o gráficos mostrando los resultados de acuerdo a los objetivos planteados. Se presentan los valores de las frecuencias absolutas y porcentuales. Para comparar histopatológicamente la neoformación ósea entre el autoinjerto dental particulado y el plasma rico en factores de crecimiento utilizados como

relleno en fémur de *Oryctolagus cuniculus* se empleó la prueba Exacta de Fisher. Se consideró un nivel de significancia del 5%.

3.8.5. Discusión:

Los injertos autólogos son de fácil acceso, de menor costo y tienen pocas posibilidades de rechazo por parte del organismo. El estudio comparó histopatológicamente la neoformación ósea entre el autoinjerto dental particulado (ADP) y el plasma rico de factores de crecimiento (PRGF).

Se encontró que el ADP supera numéricamente al Plasma rico en factores de crecimiento, particularmente a los 4 meses. Sin embargo, esta diferencia clínica no se expresa en una diferencia estadística $p > 0.05$. Al igual que Gómez et al.² en su estudio no encontró una diferencia estadística significativa $p > 0.05$ al utilizar dentina autógena desmineralizada como relleno óseo.

El estudio evaluó la neoformación ósea del autoinjerto dental particulado (ADP) a los 2 y 4 meses; presentando 16,7% de neoformación ósea de 2 cruces y un 83,3% de 3 cruces. No se encontró diferencia estadística comparando la neoformación ósea medida en ambos tiempos (a los 2 y 4 meses $p = 0.9$). Por otro lado los resultados coinciden con los hallazgos de Sung-Min Park¹⁰, quién concluyó que el ADP presenta propiedades osteoconductoras y osteoinductoras ideales para regenerar hueso; por tanto un adecuado sustituto del autoinjerto óseo; evitando el uso de aloinjertos, xenoinjertos o injertos sintéticos.

El estudio evaluó la neoformación ósea del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) a los 2 y 4 meses. A los 2 meses presenta 66.7% de neoformación ósea de 2 cruces y un 33.3% de neoformación ósea de 3 cruces, por otro lado, a los 4 meses presenta 83.3% de neoformación ósea de 2 cruces y un 16.7% de neoformación ósea de 3 cruces. Sin embargo, no hay diferencia estadística en la neoformación ósea medida en ambos tiempos (a los 2 y 4 meses $p=0.9$). Por otro lado, al igual que en la investigación de Guerrero AF. et al ⁹ quien en su estudio comparó la regeneración ósea de tres grupos: Grupo A, colocación de PRFC, Grupo B, injerto aloinjerto y PRFC, Grupo C, aloplástico y Grupo D, aloplástico y PRFC. No encontró una diferencia significativa entre esos tres grupos $p>0.05$. Es decir, al utilizar el PRGF solo o combinado con otros tipos de injertos se va a obtener el mismo resultado.

Fernández.et al¹, utilizaron el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) con un material de injerto de hidroxapatita para generar hueso nuevo por la extirpación de un odontoma, el cual le trajo resultados esperados; muy al contrario, esta investigación reveló un porcentaje muy bajo de 16.7% para el PRGF, al ser utilizado sólo como material de relleno sin ningún otro injerto es por ello.

Aunque se han introducido muchos estudios de investigación y métodos de aplicación de material de injerto, todavía es difícil obtener material de injerto óseo que tenga las ventajas de hueso autógeno, sin las desventajas. De

hecho, se han llevado a cabo muchos estudios de investigación para desarrollar material de injerto óseo para reemplazar el hueso autógeno. En particular, Kim et al. Introdujo un material de injerto óseo utilizando autodiente extraído como nuevo material de injerto óseo para superar las desventajas de aloinjerto, xenoinjerto e injerto sintético.

Al igual que en la investigación de Gómez et al (2002), se utilizó los dientes incisivos centrales de los modelos animales seleccionados en este caso de conejos, los que fueron seleccionados como relleno óseo teniendo excelentes resultados y propiedades osteoconductoras incorporando en su totalidad el nuevo hueso formado.

El material conocido como autoinjerto dental particulado (ADP), es un innovador material de injerto óseo con todas las ventajas del hueso autógeno debido a sus componentes muy similares al hueso y es muy útil en situaciones clínicas. También aborda la repulsión de los pacientes al aloinjerto y xenoinjerto, proporcionando una excelente biocompatibilidad sin causar respuesta inmune, reacción de material extraño o contagio. Además, tiene osteoinducción, osteoconducción y capacidades de sustitución progresiva, y se puede fabricar en varios tamaños y formas¹⁰².

Los dientes extraídos de una persona se clasifican como residuos ambientales y deben ser eliminados por un procesador de material extraído. Tenga en cuenta, sin embargo, que el uso del ADP no es ilegal si el

paciente acepta procesar y usar sus propios dientes. A menos que sea contaminado por una lesión infecciosa, un diente no causa problemas incluso cuando el reposo radicular está en el hueso alveolar. También hay cirugías en las que el resto de la raíz se deja intencionalmente para preservar el hueso alveolar.

En esta investigación, el material de injerto óseo conocido como autoinjerto dental particulado, mostró una capacidad de cicatrización ósea rápida sin reacción inflamatoria en todos los sitios receptores independientemente de la edad y lugar de la cirugía y registró una alta tasa de éxito sin complicaciones graves¹⁰³.

3.8.6. CONCLUSIONES:

1. En la neoformación ósea a los 2 y 4 meses, entre el autoinjerto dental particulado supera numéricamente al Plasma rico en Factores de crecimiento, particularmente a los 4 meses donde obtiene un 83.3% de neoformación ósea con tres cruces. Sin embargo, esta diferencia numérica no se expresa en una diferencia estadística $p > 0.05$ ($p = 0.2$ y 0.08 , a los 2 y 4 meses respectivamente).
2. La neoformación ósea en los defectos tratados con autoinjerto dental particulado a los 2 y 4 meses no presentan diferencia significativa en la neoformación ósea según la Histopatología ósea.

3. La neoformación ósea en los defectos tratados con plasma rico en factores de crecimiento a los 2 y 4 meses no presenta diferencia estadística en la neoformación ósea según la Histopatología ósea.

3.8.7. RECOMENDACIONES:

1. Se recomienda seguir con un estudio donde se pueda ver mejor la capacidad de regeneración ósea que tiene el Plasma Rico en Factores de Crecimiento, ya que con los resultados dados en esta investigación se ha concluido que este injerto debe estar unido a otro tipo de material que le sirva como andamio.

2. Esta investigación nos muestra el uso de materiales autólogos, sería una buena idea el de tomarlos en cuenta en la práctica clínica ya que son seguros y de bajos costos, no hay rechazo por parte del individuo y lo mejor que tienen excelentes resultados.

3. Si es que se quiere realizar investigaciones en animales se deben de tomar siempre en cuenta los criterios éticos, tanto para el número de modelos animales como para el trato durante el tiempo que dure la investigación.

4. Hay que tener en cuenta que en las investigaciones de tipo experimental siempre se tiene que realizar una prueba piloto donde se reafirma el protocolo, para al momento de la ejecución de dicho trabajo no exista inconvenientes.

5. Los resultados de estudios precedentes hasta el presente estudio indican que el autoinjerto dental particulado puede ser usado como sustituto óseo para la regeneración ósea por lo cual la línea de investigación debería estudiar en el futuro la fuente del autoinjerto dental particulado y proporcionar la evidencia suficiente para su uso como un nuevo aloinjerto para procedimientos regenerativos en humanos incentivando la creación de banco de dientes en las instituciones que tengan los servicios médicos que impliquen la utilización de biomateriales para la regeneración ósea.

6. Posiblemente el número reducido de repeticiones o ensayos (6 mediciones por grupo) no refleja la diferencia estadística. Tal vez, si se hubiera ampliado la muestra, se expresaría la diferencia estadística. Es por esto que se recomienda el aumentar el número de animales y no sea de 24.

IV. REFERENCIAS:

1. Gomes M, da Silva dos Anjos M, de Oliveira Nogueira T, Guimarães S. Histologic Evaluation of the Osteoinductive Property of Autogenous Demineralized Dentin Matrix on Surgical Bone Defects in Rabbit Skulls Using Human Amniotic Membrane for Guided Bone Regeneration. Int J Oral Maxillofac Implants. 2001; 16(4): 563-71.

2. Gomes M, da Silva dos Anjos M, de Oliveira Nogueira T, Guimarães S. Autogenous Demineralized Dentin Matrix for Tissue Engineering

Applications: Radiographic and Histomorphometric Studies. Int J Oral Maxillofac Implants. 2002; 17(4): 488-97.

3. Rocío Gloria Fernández López, Ma. Del Carmen López Buendía, Eréndira Ruiz González. Plasma rico en factores de crecimiento en cirugía bucal. Presentación de caso clínico. Revista odontológica mexicana. 2005; 9 (3) : 141-146.

4. Vásquez, L.L.J., Guerrero, A.F., Torres, B.J.M., Salazar, L.S., Lom, O.A., Domínguez, A.S. Uso del plasma rico en factores de crecimiento en la regeneración ósea. 2007, 8(25) 396-398

5. Cateulani AC. Enriquecimiento de injerto autólogo con concentrado de factores de crecimiento. 2007; 2(4): 373-381.

6. Andersson L, Ramzi A, Joseph B. Studies on dentin grafts to bone defects in rabbit tibia and mandible; development of an experimental model. Dental Traumatology. 2009; 25(1): 78-83.

7. Karina Jiménez Barragán, Jorge Glicerio González Sánchez. Uso de plasma rico en factores de crecimiento para disminuir la recurrencia de fistulas nasopalatinas en pacientes con antecedente de paladar hendido. An Orl Mex 2011;56(2):63-75.

8. Víctor Mario Fierro Serna, Ricardo Martínez-Rider, José Antonio Hidalgo-Hurtado, José Martín Toranzo Fernández, Amaury de Jesús Pozos-Guillén. Colocación de plasma rico en factores de crecimiento postextracción de terceros molares inferiores: Reporte de un caso. Revista odontológica mexicana 2011;15(2):109-114

9. Guerrero AF, Brambila CA, Téllez JH, Torres BJM, Salazar LSA, Alcocer GP. Uso de plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) en combinación con biomateriales como coadyuvantes en la regeneración periodontal en defectos intraóseos. Revista mexicana de periodontología. 2011; 2(2): 57-64.

10. Sung-Min Park, In-Woong Um, Young-Kyun Kim, Kyung-Wook Kim. Clinical application of auto-tooth bone graft material. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2012; 38(1):2-8.

11. Paul Carrillo-Mora, Adriana González-Villalva, Salvador Israel Macías-Hernández, Carlos, Pineda-Villaseñor. Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa?. Cir Cir.2013; 81(1):74-82.

12. Rossani, G., Hernández, I., Alcolea, J.M., Castro-Sierra, R., Pérez-Soto W., Trelles, M.A. Treatment of burns with platelet rich plasma (PRP). Part I. *Cir.plást. iberolatinoam.* 2014; 40 (2): 229-238.
13. Han-Tsung Liao, MD, PhD, Kacey G. Marra, PhD, J. Peter Rubin, MD. Application of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Fat Grafting: Basic Science and Literature Review. *Mary Ann Liebert, Inc.* 2014; 20(1):4.
14. Ítalo de Macedo Bernardino, Ítalo de Lima Farias, Andreia Medeiros Rodrigues Cardoso, Alidianne Fábila Cabral Xavier, Alessandro Leite Cavalcanti. Use of Animal models in Experimental Research in Dentistry in Brazil. Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, State University of Paraíba, Brazil. 2014; 3:141.
15. Tae-Hoon Kim, Sung-Hee Kim, George K. Sandor, Yong-Deok Kim. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of Oral biology* 2014; 59: 550-558.
16. V. Moraschini, E.S.P. Barboza: Effect of autologous platelet concentrates for alveolar socket preservation: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2015; 44: 632–641.

17. Vernal R. Regeneración Tisular Guiada. Una Visión Actualizada. Revista dental de Chile. 2001; 92 (3): 33-44.
18. Goyoaga Sánchez E, Loughney González A, Sánchez Sánchez R, Fernández Domínguez M. Diagnóstico diferencial entre ameloblastoma y quiste radicular. A propósito de un caso. Cient. Dent. 2012; 9; 1.
19. Golberg P, Deister E, Gutiérrez A, Sánchez P. Bases científicas de la implantología. Rev. ADM. 2003; 60 (3):110-14.
20. Sakshi G, Kamalpreet C, Harkirat S. Guided Bone Regeneration. Indian Journal Of Dental Sciences. 2012; 4(1): 87-89.
21. Hollinger J O, Buck D C, Bruder S P. Biology of bone healing: Its Impact on clinical therapy. Tissue Engineering: Applicationns in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Editorial: Quintessence Books. 1999, Illinois- Estados Unidos.
22. Garg A. Grafting materials in repair an restoration. Tissue Engeneering: Aplicationns in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Editorial: Quintessence Books, 1999 Illinois – Estados Unidos.
23. Marx RE. Platelet rich plasma: Evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg. 2004; 62: 489-96.

24. Lynch S E. Introduction. Tissue Engeneering: Aplicacionns in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Quintessense Books,1999 Illinois-Estados Unidos.
25. Marx R E. Platelet–Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. Tissue Engeneering: Aplicacionns in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Quintessense Books.1999, Illinois - Estados Unidos.
26. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with aplicaciones in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofacial Surg. 1997;55:1294-1299.
27. Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (P.R.G.F). Puesta al día publicaciones, S.L. 2000 Vitoria-España.
28. Camelo M, Nevins M L, Schenk R K, Lynch S E. Regeneración periodontal en bifurcaciones se clase II en seres humanos mediante el uso de factor de crecimiento plaquetario humano recombinante purificado-BB (rhPDGFBB) y aloinjerto óseo. Revista Internacional de Odontología Restauradora y Conservadora. 2003;7(3): 225-37.

29. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):638-46.
30. Anitua E. La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia (P.R.G.F.). *RCOE.* 2001;6(3):305-15.
31. Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: A clinical note. *Int J Oral Maxillofac Implant.*2000;15(6):879-82.
32. Lozada JL, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I-Background and processing techniques. *J Oral Implantol* 2001;27:38-42.
33. Efeoglu C, Akçay YD, Ertürk S. A modified method for preparing platelet rich plasma: An experimental study.*J Oral Maxillofacial Surg.*2004;62(14):03-7.
34. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofacial Surg.*1994;52:161-6.

35. De Obarrio JJ, Aráuz-Dutari J I, Chamberlain TM, Croston A. Uso de factores de crecimiento autólogos en cirugía periodontal: Biotecnología de gel de plaquetas: Informe de casos. *Revista Internacional de Odontología Restauradora y Conservadora*; 2000 4(5): 511-21.
36. Rodríguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61: 157-63.
37. Spector M. Basic principles of tissue Engineering. *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Editorial: Quintessence Books.1999, Illinois -Estados Unidos.
38. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of Platelet – rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofacial Surg* 2004;62:555-8.
39. Atala A. Engineering organs.*Curr Opin Biotech*2009;20(5) 575-592.
40. Atala A. Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1(2):83-96.

41. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomater* 2006;27(18):3413-3431.
42. Baino F, Vitale-Brovarone C. Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2011;97(4):514-535.
43. Singh M, Berkland C, Detamore MS. Strategies and applications for incorporating physical and chemical signal gradients in tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(4):341-366.
44. Kretlow JD, Young S, Klouda L, Wong M, Mikos AG. Injectable biomaterials for regenerative complex craniofacial tissues. *Adv Mater* 2009;21(32-33):3368-3393.
45. Mikos AG, Herring SW, Ochareon P, Elissei N, Lu HH, Kandel R, Schoen FJ, Toner M, Mooney D, Atala A, Van Dyke ME, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. *Tissue Eng* 2006;12(12):3307-3339.
46. Campos A. *Cuerpo, histología y medicina.*, De la descripción microscópica de la ingeniería tisular. Ed. Instituto de España Real Academia Nacional de Medicina. 2004; pp. 41-99.

47. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am* 2010;54(2):313-324.
48. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*2003;21:1025–1032.
49. Chandrhasa S, Murray PE, Namerow KN. Proliferation of mature ex vivo human dental pulp using tissue engineering scaffolds. *J Endod* 2011;37(9):1236-1239.
50. Yang KC, Wang CH, Chang HH, Chan WP, Chi CH, Kuo TF. Fibrin glue mixed with platelet-rich fibrin as a scaffold seeded with dental bud cells for tooth regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002.
51. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*2010;36(11):1805-1811.
52. May H. The regeneration of bone transplants. *Ann Surg*1937; 106(3):441-453
53. Johnson EO, Troupis T, Soucacos PN. Tissue-engineered vascularized bone grafts: basic science and clinical relevance to trauma and reconstructive microsurgery. *Microsurgery* 2011;31(3):176-182.

54. Taylor JA. Bilateral orbitozygomatic reconstruction with tissueengineered bone. J CraniofacSurg 2010; 21(5):1612-1614.
55. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. Av Periodon Implantol. 2012; 24, 3: 133-138.
56. Ten Cate AR. Periodonto. En Histología Oral. Desarrollo, estructura y función.. Ed. Médica panamericana. Buenos Aires, 1986, 2ª ed., pp 20-30.
57. Cooper L. Biologic Determinants of bone formation for oseointegration: Clues for future clinical improvements. The Journal of Prosthetic Dentistry. 1998; 80: 439-449.
58. Gartner LP, Hiatt JM. Cartílago y Hueso. En: Texto Atlas de Histología. Ed Mc. Graw-Hill. Madrid, 2007, 3ª ed.,pp 131-56.
59. Ripamonti U, Ramoshebi L, Maatsaba T, et al. Bone induction by BMPs/OPs and related family members in primates. The Journal of Bone and Joint Surgery 2001. Vol. 83-A, Supplement 1 part 2: 116-27.
60. Lang NP, ecker W, Karring T. Formación del hueso alverolar. En: Lindhe J, eds. Periolontología clínica e implantología odontológica. Ed. Médica Panamericana Madrid, 2000 3ª ed. pp 916-48.

61. Fontana S, Olmedo D, Crosa ME, y col. Effect of Platelet Rich Plasma on the Peri-implant Bone Response. An Experimental Study. *Implant Dent.* 2004;13:73-8.
62. Glowacki J, Mulliken JB. Demineralized bone implants. *Clin Plast Surg.* 1985;12:233-41.
63. Molly L, Vandromme H, Quirynen M, Schepers E, Adams JL, Van Steenberghe B. Bone Formation following implantation of bone biomaterials into extraction sites. *J Periodontol* 2008;Jun 79 (6):1108-15.
64. S. Ochandiano Caycoya. Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales aloplásticos. *Rev. Española Cirugía Oral y Maxilofacial* 2007;29(1):21-32.
65. Bucholz RW. Non allografts osteoconductive bone grafts substitutes. *Clin orthop* 2002;395:44-52.
66. Kim YK, Kim SG, Byeon JH, Lee HJ, Um IU, Lim SC. Development of a novel bone grafting material using autogenous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:496-503.
67. Anitua E, Andía I. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). En: Anitua E, Andía I, editores. *Un nuevo enfoque en la regeneración ósea.*

Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Vitoria-España. Puesta al Día Publicaciones, 2000: 13-55.

68. Anitua E. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Gaceta Dental. España, 2001; 123: 50-54.

69. Anitua E (b). Factores de crecimiento plasmáticos. Una revolución terapéutica. Ideas y trabajos. Odontoest. España, 2001; 2:8-37.

70. Anitua E (c). La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia (PRGF). Rev Col Odon Est 2001; 6(3):305-315.

71. Guyton AC, Hall J. Hemostasia y coagulación sanguínea. En: Guyton AC, Hall J, editores. Tratado de Fisiología Médica. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México, 1997: 505-513.

72. Marx R, Garg A. The Biology of Platelets and the Mechanism of Platelet-Rich Plasma. En: Marx R, Garg A, editores. Dental and Craniofacial Applications of P.R.P. Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago, 2005:3-65.

73. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol.* 2007;19(1): 39-52.

74. Atiya B, Shanmuhasuntharam P, Huat S, Abdulrazzak S, Oon H. Liquid Nitrogen-Treated Autogenous Dentin as Bone Substitute: An Experimental Study in a Rabbit Model. *Oral & Craniofacial Tissue Engineering.* 2012; 2(3): 215-20.

75. Rios-Villasis K. comparación de la densidad ósea en defectos tratados con membrana amniótica liofilizada vs. Membrana de colágeno utilizando tomografía Cone Beam e Histomorfometría ósea, en fémur de conejos [Tesis para optar el título de Magister en estomatología]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Estomatología; 2012-

76. Sanzana-Salamanca ES. Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona. Facultad de Estomatología; 2006.

77. Atiya B, Shanmuhasuntharam P, Huat S, Abdulrazzak S, Oon H. Liquid Nitrogen-Treated Autogenous Dentin as Bone Substitute: An

Experimental Study in a Rabbit Model. Oral & Craniofacial Tissue Engineering. 2012; 2(3): 215-20.

78. PiaggioBravo LA, Saccaquispe Contreras SJ. Comparación histológica de la reparación ósea alveolar post-exodoncia utilizando una membrana colágena tipo esponja y un material de sulfato de calcio. Rev Estomatol Herediana. 2008;18(2):93-8.

79. Bonete Lluch DJ. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización del plasma rico en plaquetas en la curación de los defectos óseos. [Tesis Doctoral]. Valencia: Universidad de Valencia. Facultad de Medicina y Odontología; 2006.

80. AL-Namnam NM, Shanmuhasuntharam P, Ha KO, Siar CH. Processed Allogenic Dentine as a Scaffold for Bone Healing: An in vivo study. Aust J Basic Appl Sci. 2010; 4(12): 5932-40.

81. Meredith A. Rabbit dentistry. EJCAP. 2007;17(1):55-62.

82. Vicente Jimenez-López. Carga o Función inmediata en implantología. Ed. Quintessence, S.L. 2004.

83. Maria del Mar Jovani Sancho. El plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea post-exodoncia. Estudio radiográfico. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. 2009

84. Delgado N, Revuelta M. Guía Práctica para el manejo de animales de laboratorio. Mexico DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1993.
85. González-Redondo P. Taller de Cunicultura [Documento en línea][Fecha de acceso: mayo 2009]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2006.
Disponible en:
<http://alojamientos.us.es/gprodanim/PCA/tallerCunicultura.pdf>.
86. McDonell WM. Manual de Cirugía Experimental. México DF: Editorial El Manual Moderno; 1979.
87. Zumano H. Farmacología Veterinaria. 2da Edición. México DF: Mc Graw-Hill Interamericana; 1997.
88. Thunder RM, Chang J, Broome RL, Most D. A Method for Immobilizing the Forelimbs of Rabbits. Contemp Top Lab Anim Sci. 1998 Sep;37(5):94-95.
89. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC: National Academy Press; 1996
90. Ruiz L. El Conejo, Manejo, Alimentación, Patología. 2da Edición. Madrid: Ed. Mundi-Prensa; 1983.

91. Organización Mundial de Sanidad Animal. Código Sanitario de Animales Terrestres [Documento en Línea]. Paris: OIE; 2004. {Fecha de Acceso: Mayo 2009} Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_sommaire.htm
92. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Mejorando la nutrición a través de huertos y granjas familiares: Manual de Capacitación para Trabajadores de campo en América Latina y el Caribe. Roma: FAO; 2000.
93. Martínez, G.; Llamosa, L.; Beltrán, V.; Cantén, M. & Fuentes, R. Terapia periodontal mediante prote.nas derivadas de la matriz del esmalte y aloinjerto .seo. Int. J. Odontostomat., 5(3):279-286, 2011.
94. Jaramillo CD, Rivera JA, Echavarría A, O"byrne J, Congote D, Restrepo LF. Rev Colomb Cienc Pecu 2009; 22: 117-131.
95. José R. Zanchetta. Osteoporosis, Fisiopatología, Diagnóstico, Prevención y Tratamiento. Ed. Panamericana. Argentina 2001. Pág. 214-216.
96. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone re-generation II. The remodeling process. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E151-7.

97. Instituto Nacional de Salud. Manejo del animal de laboratorio [Documento en Línea]. 1era Ed. Perú. Pág. 1-30 Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/2/jer/normatividad_01/MANUAL%20PROCEDIMIENTOS%20CIEA.pdf
98. Alpiste-Illueca FM, Buitrago-Vera P, de Grado-Cabanilles P, Fuenmayor-Fernandez V, Gil-Loscos FJ. Periodontal regeneration in clinical practice. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11: E382-92.
99. Christgau M. Materiales óseos y materiales sustitutivos óseos: su papel en el tratamiento periodontal regenerativo. 2010: 20 (2):95-98.
100. Ortiz Pérez, Sergio; Yolanda Arce, Alma. REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA: PRESENTACIÓN DE CASO CON EVIDENCIA HISTOLÓGICA. Revista Científica Odontológica, 2011, 7(2). pp. 64-69.
101. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965; 150: 893-900.
102. Murata M, Akazawa T, Takahata M, Ito M, Tazaki J, Hino J, et al. Bone induction of human tooth and bone crushed by newly developed automatic mil. J Ceram Soc Jpn 2010; 118:434-7.
103. Schwartz Z, Melloning JT, Hensel NF. Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft to induce new bone formation. J Periodontol 1996; 67:918-26.

V. ANEXOS

ANEXO 1: Anestesia General

XILACINA:

- Posee propiedades analgésicas importantes y de relajación muscular.
- Es un sedante con propiedades alfa 2 adrenérgicas de uso exclusivo en medicina veterinaria.
- Indicado en equinos, bovinos, caprinos, ovinos, caninos, felinos y especies silvestres.
- Se utiliza con frecuencia en protocolos anestésicos en perros y gatos, combinado con acepromacina o ketamina.
- Después de la inyección IV los efectos puede surgir entre 2 y 3 minutos.
- También puede ser utilizado en procedimientos anestésicos menores.
- Disponible en presentaciones al 2% y 10%. Debe ponerse especial atención a la concentración para evitar sobredosis accidentales.
- Aplicar 0.5 ml/10 kg de peso por vía endovenosa (1,1mg/Kg).



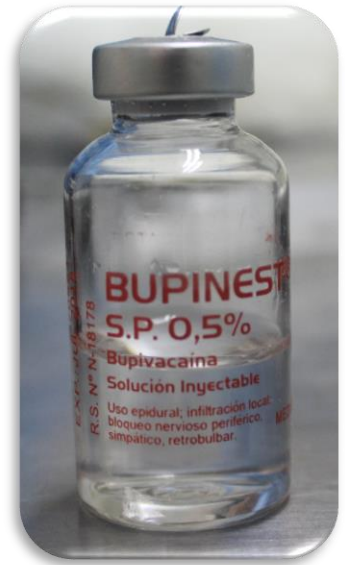
KETAMINA:

- Utilizado para anestesia general corta. Para producir una inmovilización del paciente con la finalidad de realizar maniobras quirúrgicas.
- Para premedicación, inducción y mantenimiento de la anestesia en todas las especies animales, como agente anestésico único o combinado.
- En Conejos se administra por vía intramuscular: 20-40 mg/kg.



BUPIVACAÍNA:

- La Bupivacaína es un moderno anestésico local del grupo de las amidas. Su acción es prolongada y se extiende de 4 a 8 horas.
- La potencia de la Bupivacaína es de 2 a 4 veces superior a la lidocaína y su margen de seguridad es aún mucho mayor.
- La acción de la Bupivacaína comienza de 3 a 20 minutos luego de su aplicación.
- Es una solución inyectable acuosa, que contiene el equivalente a 5,0 mg de Bupivacaína Clorhidrato por cada ml de solución inyectable estéril.
- Uso epidural, infiltración local, bloqueo nervioso periférico, simpático, retrobulbar.



MIDAZOLAN:

- Es utilizada principalmente como pre medicación a la anestesia y en combinación con anestésicos como la ketamina para disminuir el riesgo de convulsiones.
- En combinación con ketamina se utiliza a dosis de 0.1 – 0.3 mg/Kg
- Posee bajos efectos depresores sobre el sistema cardiorrespiratorio
- Cuando se usa solo o en combinación con agentes anestésicos, debe mantenerse el monitoreo cardiaco y respiratorio.





ANEXO 2: CONEJOS INSTALADOS EN EL BIOTERIO





ANEXO 3: ASILAMIENTO DE LOS CONEJOS UN DIA ANTES DE LA CIRUGÍA



ANEXO 4: PREPARACIÓN DE LOS CONEJOS ANTES DE SOMETERLOS A CIRUGÍA



- 1. Peso de conejos para la dosis de anestésicos.**

- 2. Toma de signos vitales antes de la cirugía.**



3. Pre anestesia



4. Anestesia Epidural



5. Anestesia General

ANEXO 5: INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA



1. Depilación de la zona quirúrgica.



2. Asepsia del campo operatorio.

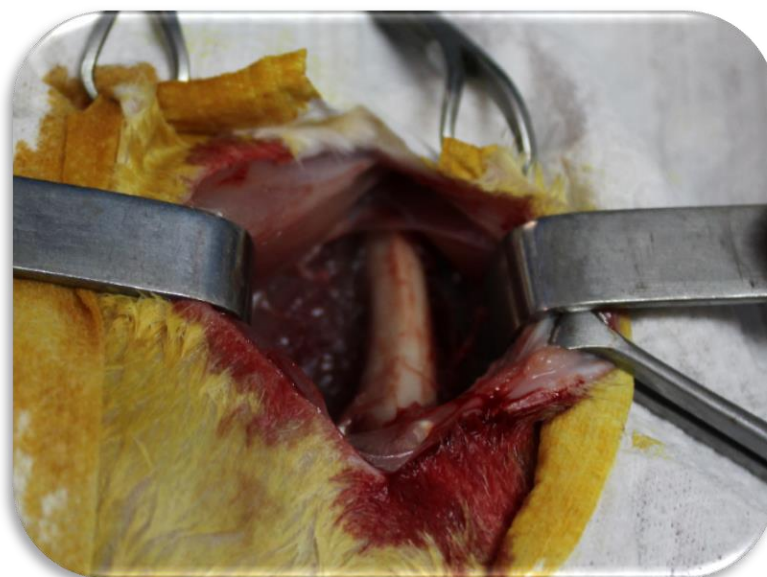
3. Aislamiento del campo operatorio.



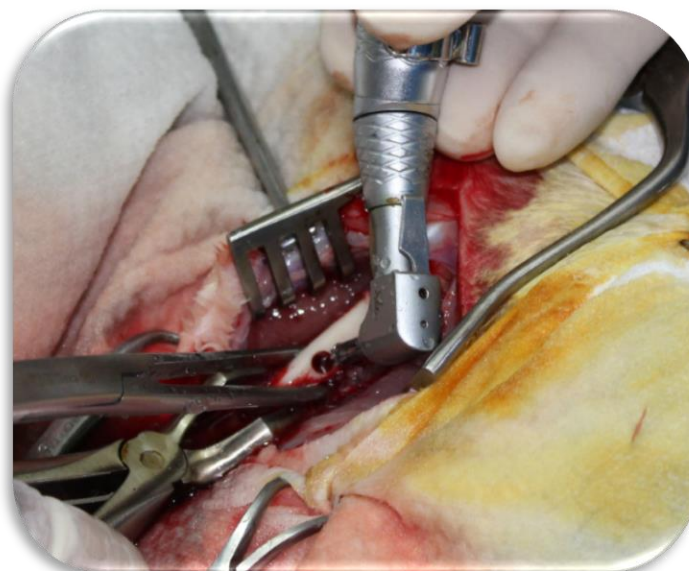
4. Incisión lineal.



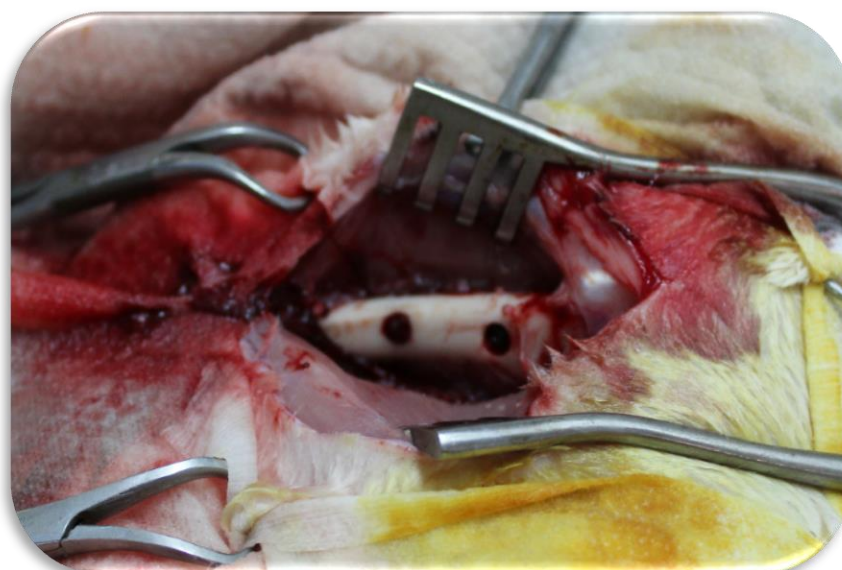
5. Decolaje y exposición del fémur.



6. Creación de defecto óseo con trefina de 0.3mm utilizando el micromotor de implantes.



7. Creación de los dos defectos óseos.



ANEXO 6: PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO

1. Extracción sanguínea directa del corazón (20ml).

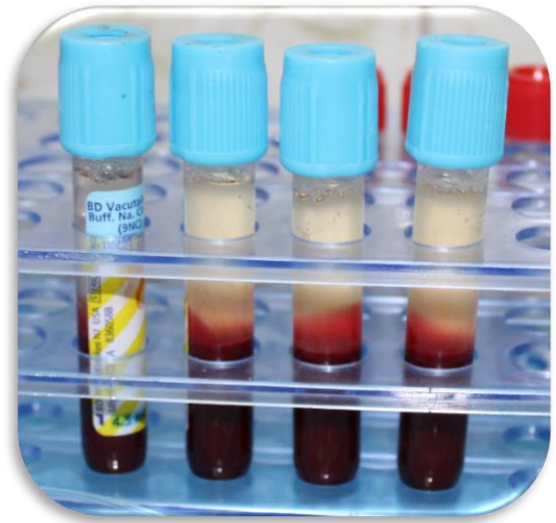


2. Llenado de los vacumtubes para su posterior centrifugado.

3. Centrifugado de los 4 tubos a 1800rpm por 9 minutos.



4. Tubos centrifugados.

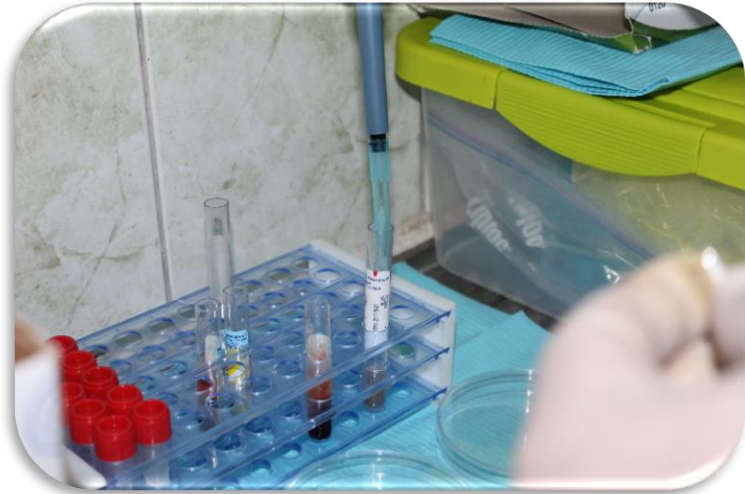


**5. Se obtiene 500 uL (Fracción I).
Utilizando una micropipeta de Pasteur.**

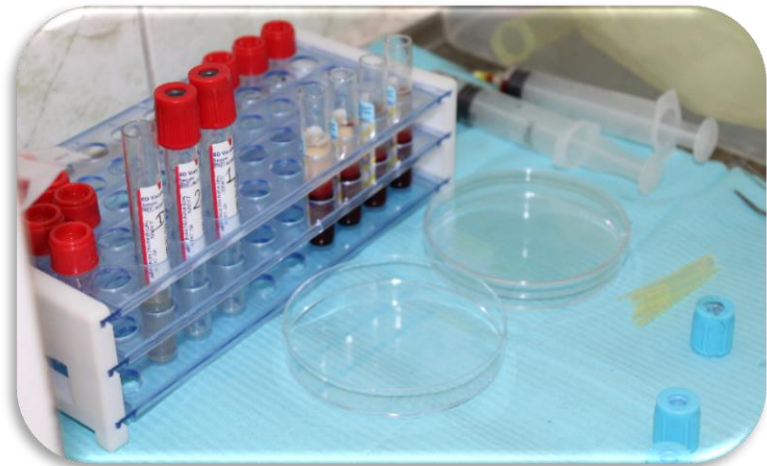
6. Se recolecta 5 cc de PGF.



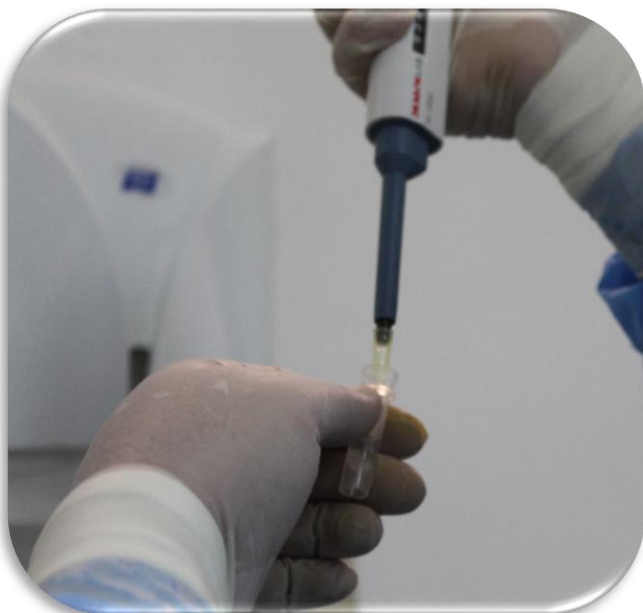
7. Se obtiene 2 cc de biológico que se coloca en el primer tubo de ensayo.



8. Seguido se recoleta 0.3cc de PRGF (Fracción III).



9. Se realiza la activación adicionando 60 UI de cloruro cálcico al 10% sextahidratado. Utilizando una micropipeta de Pasteur de 1 a 100 UI.



10. Activación del tubo de ensayo #2 con el cloruro cálcico.

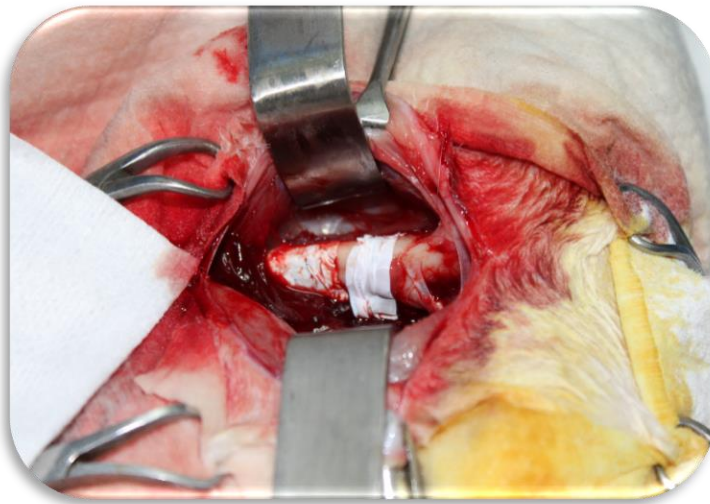
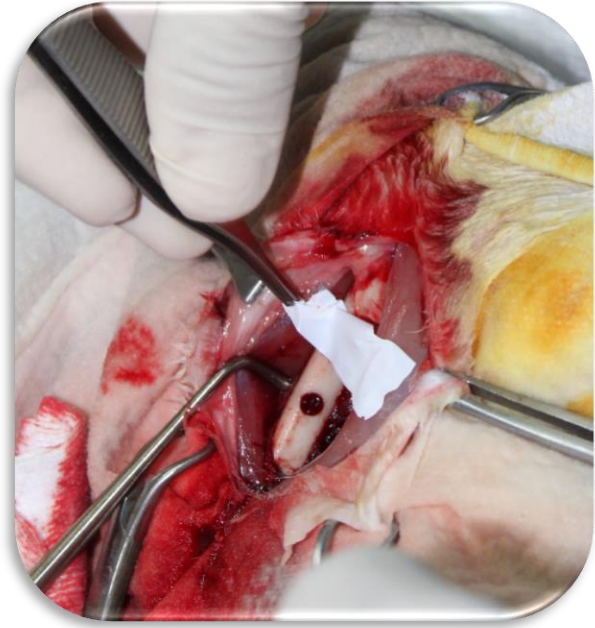


11. Obtención del PRGF, que utilizaremos como relleno óseo,



12. Colocación del injerto en el defecto óseo. (PRGF)

13. Se cubre el defecto con relleno óseo y el defecto sin tratar con cinta teflón.



14. Se cubren ambos defectos con cinta teflón.



15. Sutura por planos con ácido poliglicólico.



16. Sutura terminada.

ANEXO 7: AUTOINJERTO DENTAL PARTICULADO

1. Dientes seleccionados:
incisivos centrales inferiores.



2. Se procede a cortar los dientes seleccionados con un disco de carburo utilizando un dremell.



3. Las piezas cortadas se colocan en el particulador de hueso.



4. Usamos el particulador para obtener nuestro autoinjerto dental particulado..

5. Colocamos en una placa petrix estéril el diente ya particulado.

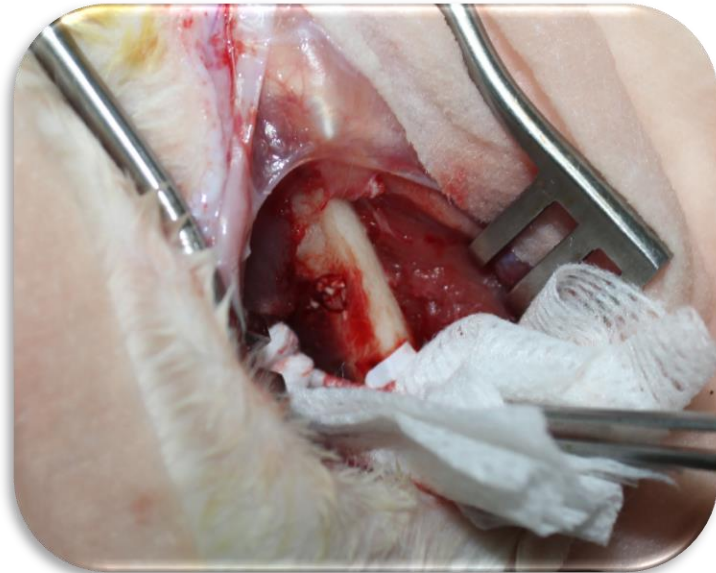


6. Obtenemos nuestro autoinjerto dental particulado (ADP).

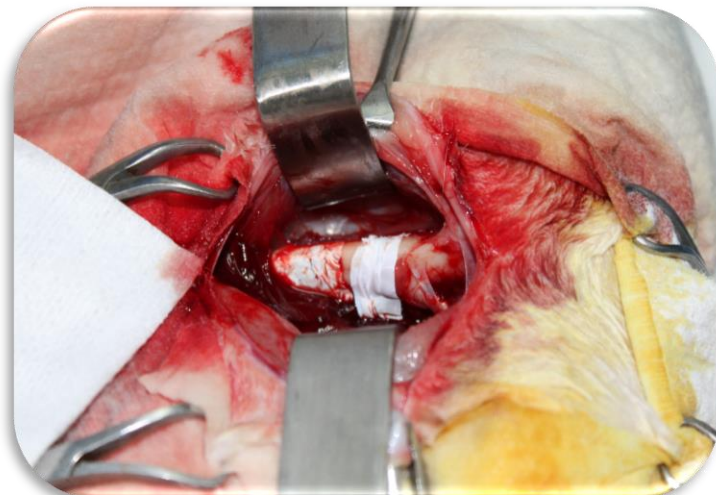
7. Colocamos nuestro injerto dental particulado en el defecto óseo seleccionado.



8. Tenemos un defecto con nuestro ADP y otro sin tratar.



9. Envolvermos ambos defectos con cinta teflón para tener una ROG.





10. Suturamos por planos con ácido policoglicólico.



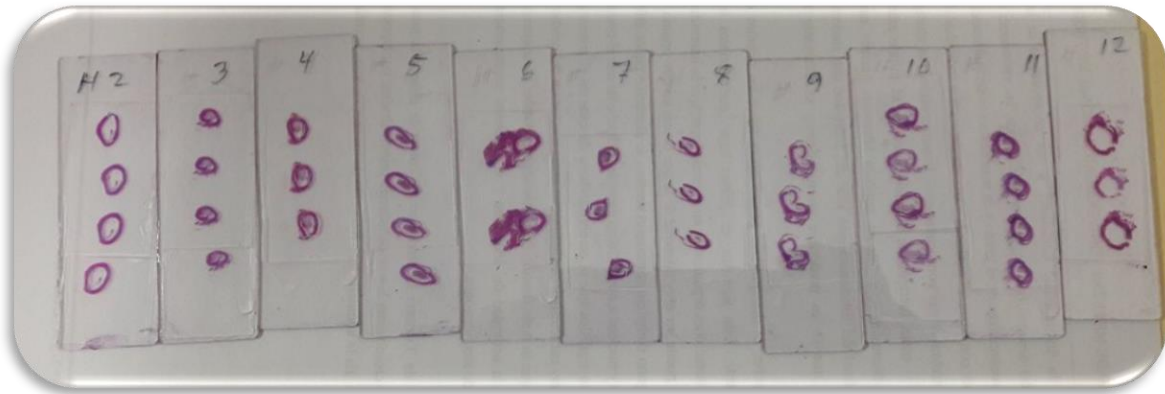
11. Sutura terminada.

ANEXO 8: MEDICAMENTOS POST-OPERATORIOS KETOPROFENO:

- Excelente tolerancia después de la aplicación intramuscular.
- Es un AINE con propiedades analgésicas (impide la percepción del dolor) y antipiréticas.
- Administración en conejos: Intramuscular 3 mg/kg c/24h x 7 días.

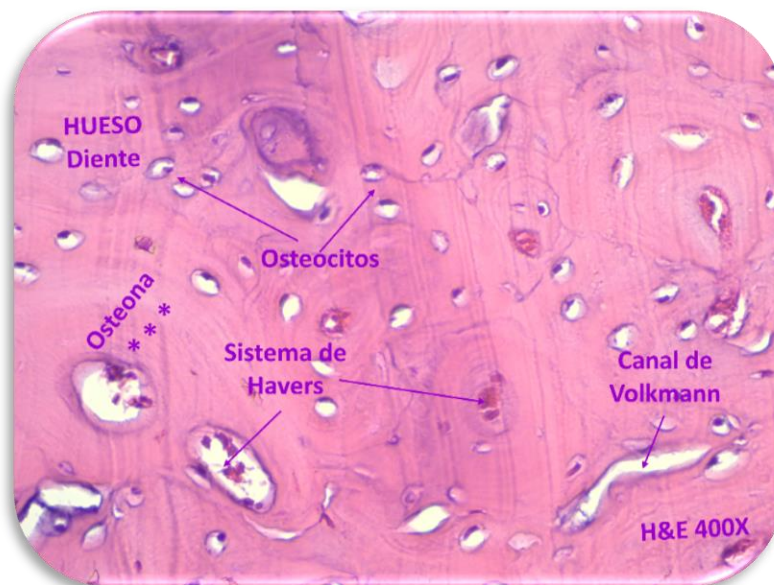


ANEXO 9: MUESTRAS HISTOPATOLÓGICAS



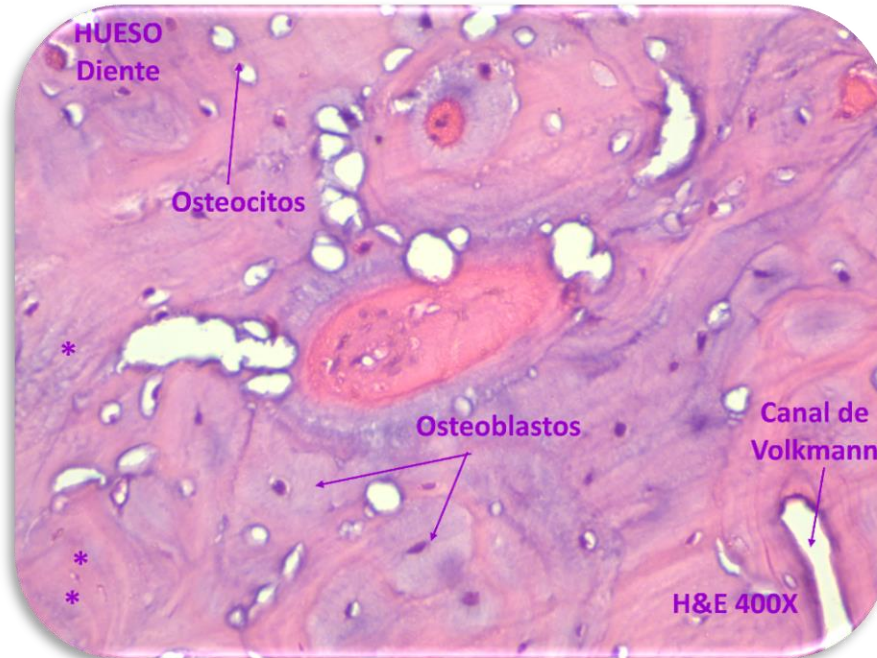
1. Láminas listas para la lectura histopatológica.

MUESTRA HISTOPATOLÓGICA UTILIZANDO AUTOINJERTO DENTAL PARTICULADO COMO RELLENO ÓSEO SEGÚN TIEMPO (2MESES)



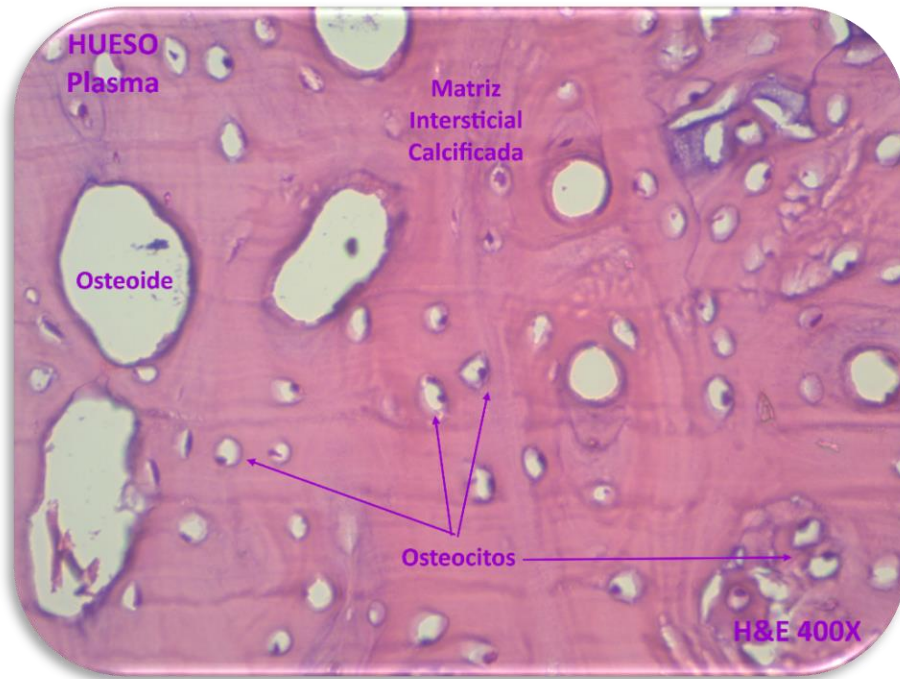
Actividad del sistema de Havers (vasos sanguíneos y nervios) importantes en el control de calcio e irriga los osteocitos (+++). Las laminillas de colágeno (*) que rodean las osteonas provocan fuerza y resistencia a la matriz del hueso en reparación. Efectos que se atribuyen al auto-injerto dentario por su contenido en calcio.

**MUESTRA HISTOPATOLÓGICA UTILIZANDO AUTOINJERTO DENTAL
PARTICULADO COMO RELLENO ÓSEO SEGÚN TIEMPO (4MESES)**



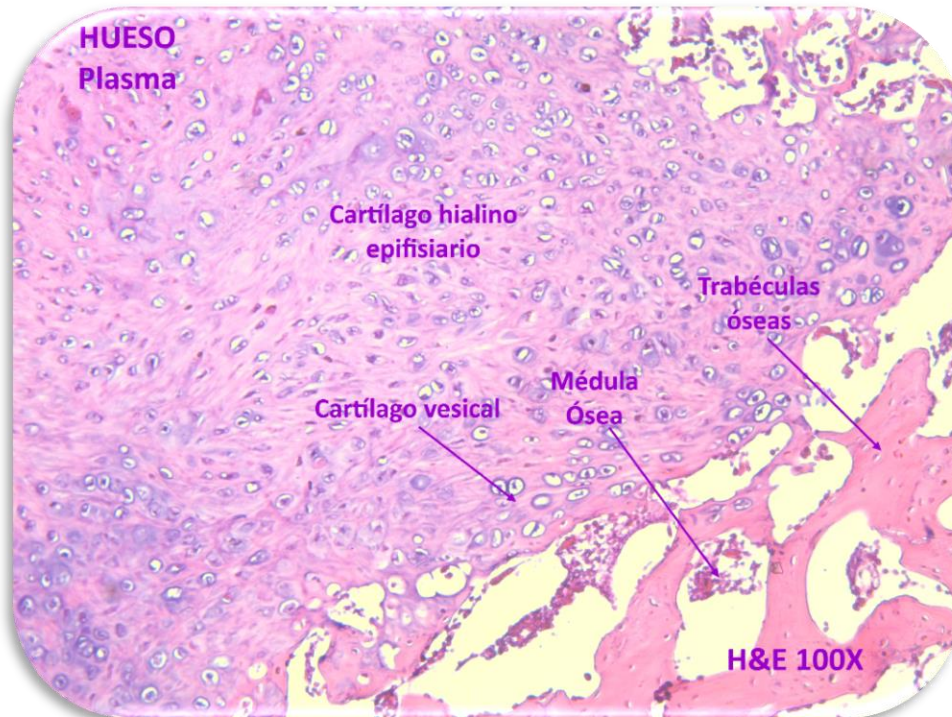
Hueso compacto. Intensa actividad de osteoblastos (+++) indicativo de reparación a lesión ósea (implante). La presencia moderada de osteocitos (++) corresponde a la transformación de osteoblastos. Se aprecia la presencia de fibras colágenas (**) rodeando al canal de Hevers (osteonas). Actividad atribuible al auto-injerto dentario por sus participación en la osteogénesis y no existe rechazo inmunológico.

**MUESTRA HISTOPATOLÓGICA UTILIZANDO PLASMA RICO EN FACTORES
DE CRECIMIENTO COMO RELLENO ÓSEO SEGÚN TIEMPO (2MESES)**



Matriz de hueso maduro cuya que destaca por la considerable cantidad de osteocitos (++) indicativo de modificación de los osteoblastos por efecto del factor de crecimiento incluido en el plasma.

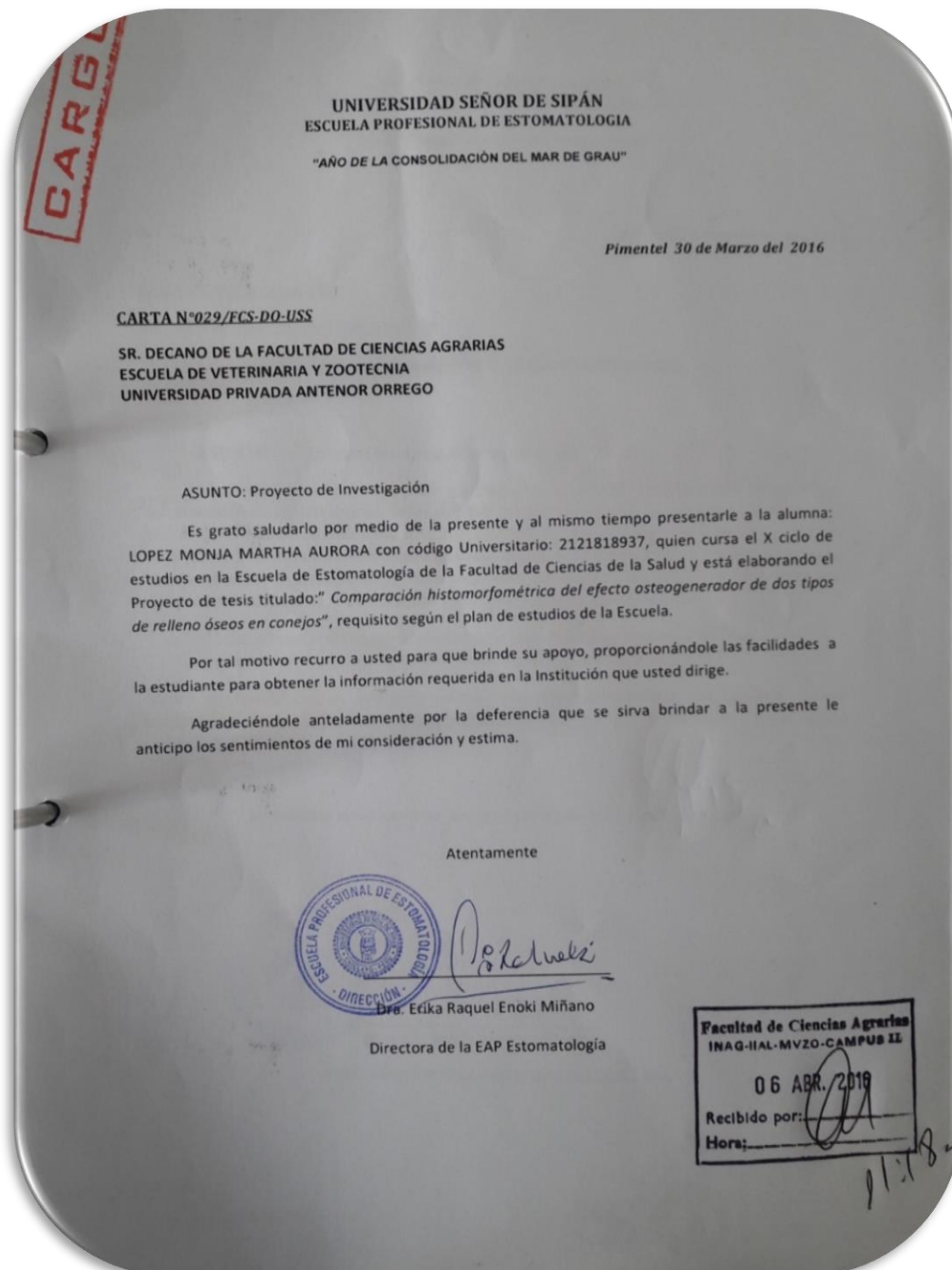
MUESTRA HISTOPATOLÓGICA UTILIZANDO PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO COMO RELLENO ÓSEO SEGÚN TIEMPO (4MESES)



Osificación endocranal. Epífisis Fémur. Hueso trabecular. Reflejo de un estadio de intensa síntesis ósea por sustitución. El cartílago se observa latente sin un orden columnar muy probable a la actividad del factor de crecimiento (++) . La zona de cartílago vesical no muy pronunciada la cual será removido por los condroclastos.

ANEXO 10:

**PERMISO DE PARTE DE LA USS PARA BRINDAR INFORMACIÓN SOBRE
EL USO DE LAS INSTALACIONES DE LA UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR
ORREGO-TRUJILLO**



ANEXO 11:

**SOLICITUD POR PARTE DE LA ESTUDIANTE PARA EL USO DE LAS
INSTALACIONES DE LA UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

Dr.

Wilson Castillo Soto

Director de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia

UPAO

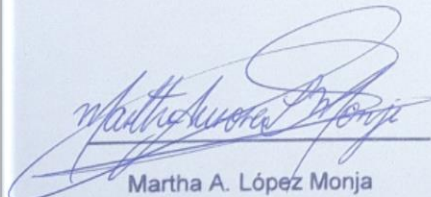
Estimado Dr. Castillo:

Reciba Ud. Un cordial saludo, soy Martha Aurora López Monja, alumna de la Universidad Señor de Sipán del IX ciclo, actualmente me encuentro desarrollando el proyecto de tesis: **COMPARACIÓN HISTOMORFOMÉTRICA DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA CON AUTOINJERTO DENTAL PARTICULADO Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN FÉMUR DE CONEJOS**. La presente carta tiene la finalidad de informar brevemente el objetivo del estudio, que es el siguiente:

La necesidad de encontrar el biomaterial de regeneración ósea ideal al tejido óseo perdido a llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de matriz orgánica e inorgánica que sean biocompatibles con el tejido óseo y que no solo cumplan con ser un aporte científico, sino que también causen un impacto social, que permita al profesional realizar tratamientos regenerativos a costos probablemente más accesibles para los pacientes. El objetivo del proyecto es: Comparar histomorfológicamente la neoformación ósea entre el autoinjerto dental particulado y la plasma rica en plaquetas utilizados como relleno óseo en fémur de conejos.

Según los antecedentes obtenidos el modelo animal es adecuado para este tipo de estudios experimentales, por lo cual, su desarrollo se debe dar en ambientes adecuados y bajo la asesoría de profesionales calificados en el área de veterinaria, es por eso que pido a Ud. me pueda brindar un área en el bioterio de la Facultad de Veterinaria para llevar a cabo el desarrollo del proyecto que tiene como duración 4 meses para la prueba piloto y posteriormente 4 meses para la ejecución del proyecto de tesis, teniendo en cuenta que yo me responsabilizo en el aporte de la alimentación balanceada, limpieza entre otros requerimientos para que la estancia de los conejos sea la adecuada y no perjudique el posible ambiente.

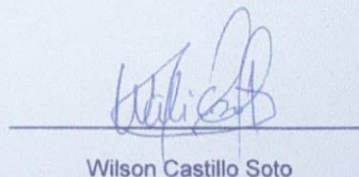
Agradeciendo la atención que le brinde a la presente, me despido. Cordialmente,



Martha A. López Monja

DNI: 72248393

Cód. 2121818937




Wilson Castillo Soto

Director de Facultad de Veterinaria
y Zootecnia

UPAO

ANEXO 12:

**CARTA DE ACEPTACIÓN DEL USO DE LAS INSTALACIONES DE LA
UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

 **UPAO** | Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

Trujillo, 13 de Junio del 2016

OFICIO N° 292-2016-MVZO-UPAO.


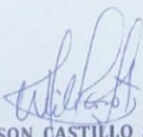
Señor Doctor
OSCAR MARTIN DEL CASTILLO HUERTAS
Director
Escuela Profesional de Estomatología
Universidad Señor de Sipán
Presente.

De mi consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo, e informarle que a solicitud de la estudiante Martha Aurora López Monja, del IX ciclo de la Escuela Profesional de Estomatología que usted dirige, la Facultad de Ciencias Agrarias a través de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia le brindarán las facilidades en las instalaciones de la unidad de animales menores, para que realice la fase experimental de su tesis titulada "Comparación histomorfométrica de la neoformación ósea con autoinjerto dental particulado y plasma rica en plaquetas en fémur en conejo" bajo las condiciones y responsabilidades que establece en la solicitud.

Sin otro particular, le reitero mi saludo y las muestras de mi aprecio y estima.

Muy atentamente.

 
Dr. WILSON CASTILLO SOTO
Director
Escuela Prof. de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Av. América Sur 3145 Monserrate Trujillo - Per
Telf: (+51) (044) 604444 Anexo 143
Fax: 282900

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
www.upao.edu.pe

ANEXO 13:

**CERTIFICADO DE INSTRUCCIÓN Y CAPACITACIÓN DEL PERSONAL A
CARGO DEL CUIDADO DE LOS CONEJOS**

 **UPAO** | Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

Trujillo, 13 de Junio del 2016

OFICIO N° 298-2016-MVZO-UPAO.

Señor Doctor
OSCAR MARTIN DEL CASTILLO HUERTAS
Director
Escuela Profesional de Estomatología
Universidad Señor de Sipán
Presente.

De mi consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo, e informarle que la Br. en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Gilda Gisell Mendoza Robles, labora como técnico de laboratorio en nuestra escuela y está encargada de manejar la crianza de los animales que se utilizan en experimentación; es la mencionada bachiller quien se encargará del manejo de los conejos de la tesis de la Srta. Martha López Monja.

Sin otro particular, le reitero mi saludo y las muestras de mi aprecio y estima.

Muy atentamente.



Dr. WILSON CASTILLO SOTO
Director
Escuela Prof. de Medicina Veterinaria y Zootecnia

■ Archivo
WCS/Gerardo.

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTEOR ORREGO
www.upao.edu.pe

Av. América Sur 3145 Monserrate Trujillo - P.
Tel: (+51)043 604444 anexo 141
Fax: 262900

ANEXO 14:

CERTIFICADO DE SUSTENTO DEL ANIMAL EN EL LABORATORIO



TRUJILLO, 9 DE JUNIO DEL 2016

YO, VICTOR HUGO TEJADA FERNANDEZ, CON DNI NUMERO 48036523, MEDIANTE ESTE DOCUMENTO DOY A CONOCER LA PROCEDENCIA DE LOS ANIMALES DE BUNNY HOP RANCH QUE HAN SIDO SOLICITADOS POR LA SEÑORITA MARTHA AURORA LOPEZ MONJA, CONEJOS DE RAZA NUEVA ZELANDA.

ESTOS CONEJOS NACIERON DURANTE EL AÑO 2016, CRIAS DE CONEJOS DE DICHA RAZA QUE FUERON COMPRADOS DE CRIADEROS EN TRUJILLO Y LIMA DURANTE EL AÑO 2013.

EN BUNNY HOP RANCH, LOS CONEJOS SON ALIMENTADO CON ALFALFA DE NUESTROS CULTIVOS Y CON CONEJINA DE PURINA. LOS BEVEDEROS SON RELLENADOS Y LIMPIADOS ENTRE DOS A TRES VECES AL DIA CON AGUA FRESCA DE NUESTRO POZO. EL CRIADERO ES DE DISEÑO USADO EN LOS ESTADOS UNIDOS, EL CUAL PERMITE QUE CADA CONEJO TENGA SU PROPIA JAULA ELEVADA.

EN RESUMEN, BUNNY HOP RANCH OFRECE UN AMBIENTE SUMAMENTE SALUDABLE Y COMODO PARA NUESTROS CONEJOS.

VICTOR HUGO TEJADA
GERENTE GENERAL

ANEXO 15:

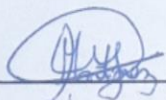
**CERTIFICADO DE ESTADO SANITARIO DE LOS SUJETOS DE
INVESTIGACIÓN (CONEJOS)**

CERTIFICADO DE ESTADO SANITARIO DE LOS CONEJOS

13 DE JUNIO DEL 2016

SRTA. LOPEZ MONJA MARTHA AURORA

YO, **MARTINEZ DIAZ YHOAN RAUL**, ESTUDIANTE DE ZOOTECNIA, NOVENO CICLO, UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO, (UNT), MEDIANTE ESTE DOCUMENTO, EL CUAL ESTOY FIRMANDO, HAGO CONSTATAR EL ESTADO DE SALUD GENERAL EN QUE LOS CONEJOS DE RAZA NUEVA ZELANDA DE BUNNY HOP RANCH SE ENCUENTRAN, HABIENDO TENIDO UN ADECUADO CUIDADO EN SU ALIMENTACION, AMBIENTE, Y LAS CONDICIONES DE ALOJAMIENTO. ADEMÁS, LOS CONEJOS SERÁN COMPLETAMENTE EXAMINADOS ANTES DE SU DEBIDA ENTREGA; ES POR TODO ELLO QUE PUEDO DECIR QUE SE ENCONTRARÁN EN OPTIMAS CONDICIONES PARA SER UTILIZADOS COMO EXCELENTES SUJETOS DE ESTUDIOS PARA SU INVESTIGACION.



SR. YHOAN RAUL MARTINEZ DIAZ
DNI 47874041

YO, **RAMIREZ SANCHEZ JULIA MERCEDES**, PROFESORA INGENIERA DE ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO, (UNT), MEDIANTE ESTE DOCUMENTO, VERIFICO QUE SOY LA ASESORA DEL ESTUDIANTE PRACTICANTE **MARTINEZ DIAZ YHOAN RAUL**, QUIEN HA HECHO SU PRACTICA EN BUNNY HOP RANCH Y AUN SIGUE APOYANDO.



DRA. ING. JULIA MERCEDES RAMIREZ SANCHEZ
DNI 16627302

ANEXO 16:

CERTIFICADO DE CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

 **UPAO** | Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

C E R T I F I C A D O

Quien suscribe, Director de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias, certifica que los procesos de crianza de animales para experimentación se realizan en ambientes adecuados, siguiendo las normas de bioseguridad; así como las prácticas de manejo, alimentación y bienestar animal adecuados. Del mismo modo los profesionales que supervisan el proceso de crianza se encuentran debidamente capacitados.

Trujillo, 17 de Junio del 2016


Wilson L. Castillo Soto
WILSON L. CASTILLO SOTO
Director
Medicina Veterinaria y Zootecnia

Archivo
v. WCA/gerenci.

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO ORREGO
www.upao.edu.pe

Az/Ámbica Sur 3145 Monserrate Trujillo - Per.
Tel: (+51)044 604444 anexo 141
Fax: 282900

ANEXO 17:

CERTIFICADO DEL PERSONAL ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA



UPAO

Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

C E R T I F I C A D O

Quien suscribe, Director de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias, certifica que el docente Mg. Cesar Lombardi Pérez, es docente de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, dedicado a la investigación en patología animal, con 20 años de experiencia en la realización de estudios histomorfométricos en diversas especies de animales.

Trujillo, 28 de junio del 2016



WILSON L. CASTILLO SOTO
Director
Medicina Veterinaria y Zootecnia

M. Arellano
e. WES/garanda

ANEXO 18:

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA DE REGISTRO DE DATOS



Nº	
SEXO:	
EDAD:	
PESO:	
GRUPO:	

FECHA EN QUE SE REALIZO LA CIRUGIA	
REGION ANATOMICA DONDE SE EFECTUO EL DEFECTO OSEO	
TIPO DE INJERTO UTILIZADO	
FECHA DE SACRIFICIO	
NEOFORMACION OSEA	