



COMPONENTES ANGIOGÉNICOS Y OSTEOGÉNICOS EN  
REGENERACIÓN ÓSEA ALVEOLAR

**Trabajo de Investigación  
Requisito para optar al  
Título de Cirujano Dentista**

Alumnos: Javiera Arévalo Berrocal  
Patricio Astudillo Pérez  
María Paz Espinosa Carmona

Docente Guía: Prof. Dr. Eduardo Couve Montané  
Facultad de Ciencias

Valparaíso - Chile  
2019

*A mi familia antes que todo, por entregar todo lo que pudieron para facilitar mi paso por esta carrera. Por su apoyo incondicional y su gran empatía, siempre celebrando mis triunfos y sufriendo conmigo en mis momentos difíciles. Llegamos juntos hasta aquí.*

*A los grandes amigos que esta carrera me ha permitido conocer, nadie mejor que nosotros podemos entender lo que ha significado este camino. No puedo sentirme más agradecida de todo el apañe y la contención que me han dado siempre. Mis más profundos deseos de felicidad y éxito a todos.*

*A los docentes que me han formado. Que no solo entregan conocimientos sino se esmeran en formar profesionales con valores, a los que dan confianza y respaldo a sus alumnos. Junto a todos los funcionarios de la UV, que nos hacen sentir como en familia dentro de la escuela.*

*A mis queridos pacientes. Gracias a tantos pacientes que se comprometieron conmigo, que compartieron mis vivencias en la clínica, me dieron su apoyo, sus felicitaciones, agradecimientos y contención. Gracias por todo el cariño y sus buenos deseos.*

*Finalmente a mi equipo de tesis: MP, PA y EC. Ha sido un gusto trabajar con ustedes. Gracias por la comprensión, paciencia y compromiso con este trabajo, por las risas, las galletas y las enseñanzas del Dr. En el LabMe. ¡Son lo más de lo más!*

**Javiera Arévalo**

*A mi madre por su infinito apoyo y entrega incondicional en cada una de mis decisiones. A mi padre por escucharme y aconsejarme a través de este largo camino  
Sin ustedes nada de esto sería posible.*

*A mis hermanos que han sido verdaderos regalos y son la fuerza tantas veces  
necesaria para no dejarme caer.*

*A mi familia materna y paterna quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron  
atentos y preocupados y me ayudaron de alguna u otra manera. Recuerdo especial a  
mi tata que a pesar de que no esté físicamente sé que estaría orgulloso de mi.*

*A mis amigos quienes con su compañía y lealtad han hecho que todo sea más  
simple, más llevadero. Hemos compartido alegrías, llantos, decepciones, momentos  
históricos, momentos de cambios y me da mucha alegría haber conocido a cada uno  
de ustedes a través de todos estos años.*

*A mis profesores, fuentes de conocimiento y experiencia que me han brindado en  
toda mi formación académica y que cumplen un rol clave en lo que soy hoy.*

*A mis compañeros de tesis en las cuales destaco la unión, la paciencia, el  
entendimiento y la dedicación. Fue una suerte trabajar al lado de dos amigas como  
ustedes. También a nuestro profesor guía el cual nos entregó grandes enseñanzas  
científicas y humanas llenas de sabiduría y desinteresadamente nos apoyó en la  
tesis desde el comienzo hasta el último minuto.*

*Finalmente a las personas que caminaron junto a mí en algún momento de esta  
etapa solo agradecerles profundamente y de todo corazón por haber compartido  
parte de su vida conmigo.*

**Patricio Astudillo**

*A mi madre y a mi hermana, que son las mujeres que más admiro.*

*A mi familia por su amor incondicional, reflejado en el apoyo infinito en cada paso de este largo camino.*

*Al gran equipo con el que tuve el regalo de trabajar. Patricio y Javiera, gracias amigos por tantos momentos buenos, por el apoyo y la fuerza en los momentos malos, por su amistad sincera y desinteresada.*

*A nuestro profesor y amigo Dr. EC. Gracias por su entrega, dedicación, confianza. Por compartir con nosotros su experiencia profesional y de vida, y por el cariño que pone en lo que hace con su vocación de enseñar.*

*Y a todos quienes colaboraron para la realización de este proyecto. Muchas gracias.*

**María Paz Espinosa**

# ÍNDICE

1. <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	7
2. <b><u>MARCO TEÓRICO</u></b> .....	9
2.1 <b><u>Hueso Alveolar</u></b> .....	9
2.1.1 <u>Desarrollo evolutivo</u> .....	9
2.1.2 <u>Organización y Composición del Hueso Alveolar</u> .....	11
2.1.2.1 Células .....	11
2.1.2.2 Matriz orgánica.....	13
2.1.2.3 Matriz inorgánica.....	13
2.1.3 <u>Dinámica ósea</u> .....	14
2.1.3.1 Fases de Remodelado Óseo .....	14
2.1.4 <u>Relación angiogénesis – osteogénesis</u> .....	17
2.1.4.1 Angiogénesis durante la formación ósea .....	17
2.1.4.2 Angiogénesis y regeneración ósea.....	19
2.2 <b><u>Regeneración ósea alveolar</u></b> .....	20
2.2.1 <u>Ingeniería de Tejidos</u> .....	20
2.2.2 <u>Requerimientos de un material de injerto</u> .....	20
2.2.3 <u>Clasificación</u> .....	21
2.2.3.1 Autoinjertos .....	21
2.2.3.2 Aloinjertos .....	22
2.2.3.3 Xenoinjertos .....	24
2.2.3.4 Materiales aloplásticos .....	24
3. <b><u>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</u></b> .....	25
4. <b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	25
4.1 <b><u>General</u></b> .....	25
4.2 <b><u>Específicos</u></b> .....	25
5. <b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	26
5.1 <b><u>Tipo de Estudio</u></b> .....	26
5.2 <b><u>Universo</u></b> .....	26
5.3 <b><u>Criterios de inclusión y de exclusión</u></b> .....	26
5.3.1 <u>Criterios de inclusión</u> .....	26
5.3.2 <u>Criterios de exclusión</u> :.....	26
5.4 <b><u>Muestras</u></b> .....	27

5.4.1 <u>Aprobación del estudio y Consentimiento informado</u> .....	27
5.4.2 <u>Forma de selección</u> .....	27
5.4.3 <u>Unidad de estudio</u> .....	27
<b>5.5 <u>Definición de las variables a estudiar</u></b> .....	<b>27</b>
<b>5.6 <u>Proceso de recolección y procesamiento de la información</u></b> .....	<b>28</b>
5.6.1 <u>Procedimientos Previos</u> .....	28
5.6.2 <u>Recolección y procesamiento</u> .....	29
<b>5.7 <u>Cortes</u></b> .....	<b>30</b>
<b>5.8 <u>Inmunofluorescencia e inmunomarcaje</u></b> .....	<b>30</b>
5.9 <u>Microscopía Óptica y Confocal</u> .....	31
<b>6. <u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>32</b>
6.1 <u>Angiogénesis</u> .....	34
6.2 <u>Osteogénesis</u> .....	35
<b>7. <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	<b>37</b>
<b>8. <u>CONCLUSIÓN</u></b> .....	<b>41</b>
<b>9. <u>RESUMEN</u></b> .....	<b>42</b>
<b>10. <u>REFERENCIAS</u></b> .....	<b>43</b>
<b>11. <u>ANEXOS</u></b> .....	<b>49</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

El hueso alveolar es la estructura que da soporte e inserción a los dientes. Forma parte de un sofisticado sistema de anclaje dentario constituido por el periodonto, el cual desde un punto de vista evolutivo, se puede considerar el más complejo en la filogenia de la dentición (1).

El hueso alveolar constituye el componente más dinámico del periodonto, y está constantemente sometido a procesos de remodelación, debido a su sensibilidad a estímulos mecánicos. Es un tejido diente-dependiente, y como tal, la presencia o ausencia de fuerzas masticatorias influyen tanto en su cantidad como en su calidad. La extracción o pérdida dentaria desencadena una serie de cambios a nivel morfológico y celular en las características y dimensiones arquitectónicas del hueso alveolar (2).

La pérdida de hueso alveolar es desfavorable para los tratamientos de rehabilitación dental, por lo que se han desarrollado numerosas técnicas y materiales de regeneración ósea. Diversos materiales son empleados en regeneración ósea, y son clasificados según su origen en autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y aloplásticos, como se muestra en la Tabla I. Estos materiales promueven la regeneración ósea a través de tres diferentes mecanismos: osteogénesis, osteoinducción, y osteoconducción. Todos ellos deben tener uno o más de estos tres mecanismos de acción (3).

<b>Tipo de material</b>	<b>Origen del injerto</b>	<b>Propiedad</b>	<b>Ejemplo</b>
Autoinjerto	Mismo paciente	Osteoconductor Osteoinductor Osteogénico	Injerto de rama mandibular
Aloinjerto	Diferente paciente de la misma especie	Osteoconductor	Hueso liofilizado
Xenoinjerto	Diferente especie	Osteoconductor	Hueso bovino
Aloplástico	Sintético	Osteoconductor	Trifosfato de Calcio

**Tabla I.** Clasificación de materiales de injerto óseo según su origen.

Además de estos mecanismos, la angiogénesis es una condición imprescindible en el proceso regenerativo, pues la formación de nuevos vasos permitirá el suministro eficiente de sangre y nutrientes, junto con respaldar y sostener el desarrollo y mantenimiento del hueso en formación. Los vasos sanguíneos también sirven como red de comunicación para el tejido óseo y el tejido circundante, estableciendo una conexión funcional entre el material de injerto y el hueso hospedero (4).

Con el fin de estudiar la dinámica ósea ante estos materiales, en el presente trabajo se aplicarán marcadores biológicos angiogénicos y osteogénicos en el hueso alveolar que ha recibido tratamiento de regeneración ósea. Se documenta el reporte de 3 casos donde se utilizó la técnica de Sticky Bone, que combina un aloinjerto (hueso liofilizado) con plasma rico en fibrina (PRF), mediante procedimientos de elevación de seno maxilar. De esta forma se estudiarán las características del hueso regenerado, y podrán ser contrastadas con las del hueso propio del paciente.

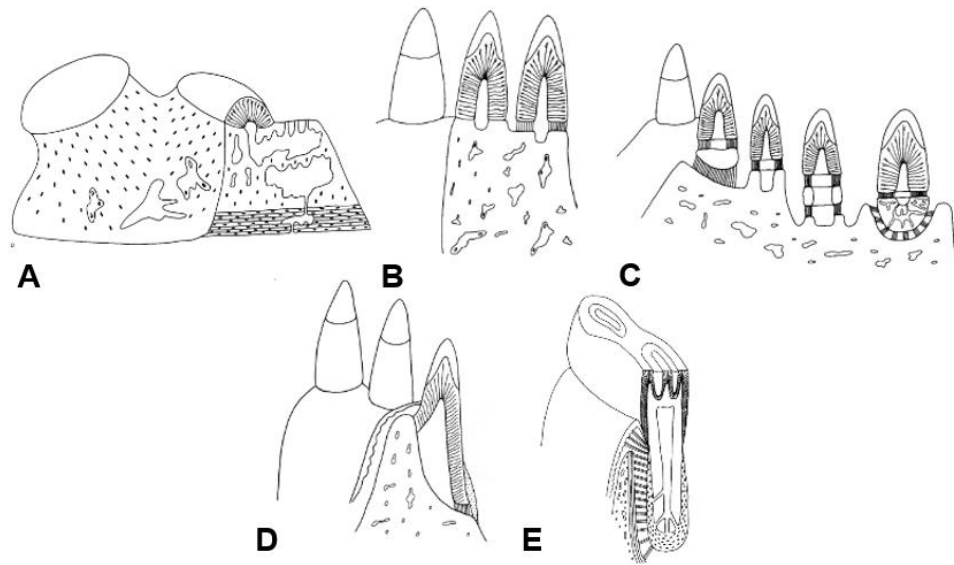
## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Hueso Alveolar**

#### **2.1.1 Desarrollo evolutivo**

El hueso alveolar forma parte de un sofisticado sistema de anclaje dentario constituido por el periodonto de inserción, junto con el cemento y el ligamento periodontal, conformando la articulación alvéolo-dentaria. Su filogenia da cuenta de que el periodonto de los mamíferos puede considerarse el más complejo de todos los sistemas de anclaje, particularmente en cuanto a estructura y función. En la evolución dentaria, se han desarrollado diferentes tipos de sistemas de anclaje periodontal. Pareciera ser que los dientes evolucionaron a partir de elementos conodontes, o bien de dentículos de tipo odontodes en los primeros agnatos cordados, antes de la aparición de la coraza dérmica y escamas placoideas (parecidas a dientes) durante la evolución de los peces. Sistemas de anclaje de mayor complejidad fueron desarrollándose principalmente en peces vertebrados, en una etapa relativamente tardía en la evolución dentaria.

Estos sistemas se clasifican principalmente en protoacrodonte, acrodonte, acro-prototecodonte, pleurodonte y tecodonte, dependiendo del área de anclaje dentaria (crestal, marginal o alveolar) y del modo de anclaje (anquilosis, fibroso o una combinación de ambas) (Figura 1). La variación evolutiva más significativa se encuentra entre los peces vertebrados acro-prototecodontes y los reptiles pleurodonte, donde se conforma lo que luego será el alvéolo dentario en mamíferos. En las distintas especies mamíferas las estructuras de cemento, fibras periodontales y epitelio de unión son distintos entre sí.



**Figura 1.** Sistemas de anclaje periodontal. **A)** Proto-acrodontes. Compuesto por las primeras estructuras similares a dientes, los odontodes. **B)** Acrodontes. Fijación del diente a la cresta marginal de la mandíbula, directamente al hueso o mediante fibras colágenas o tejido conectivo mineralizado. **C)** Acro-prototecodontes. Representan la mayor variabilidad biológica, incluyendo 5 tipos de tejidos diferentes: dentina, hueso de anclaje, aparato fibroso, hueso mandibular y epitelio de unión. **D)** Pleurodontes. Desaparecen las estructuras de unión mineralizadas, y se combina la anquilosis con la unión mediante fibras al margen interno de la mandíbula. **E)** Tecodontes. Se establece la gonfosis como articulación fibrosa entre hueso y diente, el cual se encuentra inmerso en la cresta alveolar. De Gaengler (1).

Por lo tanto, el desarrollo filogenético de estructuras de anclaje cada vez más complejas está en relación a las variaciones en:

- Forma y función de los dientes
- Patrón de recambio dental
- Patrones de erupción, tasa de crecimiento y forma de abrasión y atrición dentaria

Los reptiles representan el primer grupo cuyos dientes se encuentran en verdaderas cavidades o alvéolos. Esta es una gonfosis tecodonte, donde a diferencia de los mamíferos, dientes sucesivos ocupan el mismo alvéolo. Todos los dientes de los mamíferos placentarios poseen alvéolos. El anclaje de los dientes a la mandíbula está dado por ligamento fibroso. Las variedades en las estructuras de pedículos y huesos de anclaje de acro-prototecodontes se convirtieron en un único sistema de anclaje en tecodontes, constituido por cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar (1).

## 2.1.2 Organización y Composición del Hueso Alveolar

El tejido óseo alveolar se puede considerar uno de los tejidos más dinámicos del cuerpo humano, se encuentra en constantes procesos de formación y reabsorción lo que le permite lograr un completo remodelado óseo ante distintos escenarios determinados principalmente por la presencia y función dentaria. Las unidades básicas de remodelado óseo se encuentran en la zona cortical y es donde ocurre la formación de nuevo hueso a cargo de osteoblastos o la reabsorción dada por osteoclastos (5). Este proceso es regulado por factores locales como la actividad de factores de crecimiento y citoquinas, y por factores sistémicos como los niveles de estrógenos o calcitonina (6). El desequilibrio entre la actividad osteoblástica y osteoclástica puede desencadenar enfermedades metabólicas como la osteoporosis (7).

Las capas corticales que forman el hueso alveolar tiene un doble origen: la capa más externa de la cortical crece por aposición a partir de las regiones osteogénicas del ligamento periodontal; y la zona más interna se forma a expensas de los osteoblastos de la médula ósea adyacente. Tanto el hueso cortical como el esponjoso se constituyen por células especializadas, matriz orgánica y una matriz inorgánica mineral (8).

### 2.1.2.1 Células

- Osteoblastos:

Son derivados de células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea. Presentan una forma poliédrica y las características típicas de una célula secretora como es un retículo endoplásmico rugoso de gran tamaño y un complejo de Golgi desarrollado. En dirección a la sustancia osteoide o matriz aún no mineralizada, desarrolla prolongaciones que se conectan con los osteocitos y otros osteoblastos a través de conexinas. Los osteoblastos son los encargados de producir la matriz orgánica y también contribuyen al proceso de mineralización en dos etapas; la primera es la fase vesicular en donde vesículas matriciales producidas por osteoblastos son liberadas a la matriz del nuevo hueso en formación y promueven la mineralización. Luego, en la fase fibrilar, la enzima fosfatasa alcalina (también secretada por osteoblastos), se encarga de liberar iones fosfato dentro de las mismas vesículas, permitiendo la captura de iones calcio y la formación de cristales de hidroxapatita que sirven de núcleos de mineralización de las fibras de colágeno que conforman la matriz osteoide.

Además se han descrito funciones de los osteoblastos a nivel sistémico; Capulli et al (9) describe un efecto hipoglicemiante dado por su acción endocrina, pues mejora la sensibilidad de la insulina a nivel del tejido adiposo a través de la osteocalcina, e incluso mejora la función de las gónadas masculinas aumentando la fertilidad. En este mismo estudio se describe su actividad reguladora de osteoclastogénesis a través de mecanismos paracrinos.

La vida media de los osteoblastos es de 1 a 10 semanas, tras las cuales pueden transformarse en células de borde u osteocitos en aproximadamente un 15%, o desaparecer por mecanismos de apoptosis (10).

- Osteocitos:

En el proceso de mineralización de la matriz osteoide hay osteoblastos que quedan inmersos en ella, pasando a diferenciarse en osteocitos. Son las células más abundantes del tejido óseo, su forma es estrellada y se presentan en la zona interna de la superficie ósea. Se encuentran en contacto unas con otras y también con los osteoblastos de la superficie a través de prolongaciones citoplasmáticas llamadas conductos calcóforos. Esta red también es denominada sistema de microcirculación ósea y les permite llevar a cabo su función: proveer de nutrientes y oxígeno, y la mecanotransducción para controlar el remodelado óseo. El rol de los osteocitos en la dinámica ósea se ha estudiado mucho en los últimos años, recientes estudios mencionan la capacidad reguladora de los osteocitos en el metabolismo de fosfatos a nivel sistémico, su rol en la coordinación de la actividad osteogénica y osteoclástica, y su participación en el almacenamiento del calcio en el hueso (11).

- Osteoclastos:

Se originan a partir de la diferenciación de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos (12). Son las células encargadas del proceso de reabsorción ósea. Para lograrlo, los osteoclastos se desplazan hacia la zona a reabsorber y a través de integrinas o actinas unen su borde en cepillo a la matriz mineralizada, denominada zona de sellado, y secretan ácidos (H<sup>+</sup>) que solubilizan primero la matriz orgánica del tejido óseo y luego la mineral. La dinámica del recambio óseo es influenciada por factores generales, como la parathormona, calcitonina y la vitamina D, y por factores locales, como la IL-1, la IL-6, el factor de necrosis tumoral TNF $\alpha$ , el interferón IFN- $\gamma$ , prostaglandina y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF.

- Célula de revestimiento o de borde:

Son originadas a partir de los osteoblastos cuando han finalizado su actividad. Se encuentran en la porción más externa de la matriz ósea en las zonas donde no hay formación ni reabsorción ósea. A pesar de que su función no está completamente definida, se ha establecido como principal la de crear un límite para la matriz ósea separándola de los osteoclastos.

### 2.1.2.2 Matriz orgánica

Constituida principalmente por fibras de colágeno Col I (90%) inmersas en una matriz que contiene diversas proteínas no colágenas. Las sustancias de naturaleza no colágenas más características de la matriz extracelular, son básicamente tres:

- a) *Glicoproteínas*: son principalmente la osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea (BSP) y proteína morfogenética ósea (BMP).
- b) *Proteínas que contienen ácido gamma carboxi-glutámico*: entre ellas destaca la osteocalcina, proteína producida por osteoblastos y plaquetas que tiene como rol principal unir el calcio al colágeno, es frecuentemente usada como marcador para medir la actividad osteoblástica ya que se presenta durante la diferenciación de pre-osteoblasto a osteoblasto en el inicio del proceso de mineralización.
- c) *Proteoglicanos*: encargados de regular el depósito de sales de calcio.

Es importante recordar que la cantidad de proteínas de la matriz varían con la edad, estado nutricional, enfermedades asociadas que pueden generar alteraciones de forma de la estructura ósea o finalmente fracturas (13).

### 2.2.2.3 Matriz inorgánica

El componente mineral de la matriz es representado por los cristales de hidroxapatita en un 80%, carbonato de calcio en un 15% y un 5% de otras sales minerales como magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor.

Las proteínas de la matriz en conjunto con el colágeno proporcionan la disposición de los cristales de hidroxapatita, lo que le otorga al hueso la rigidez y resistencia características (14).

El 2% se compone por enzimas como fosfatasa alcalina, colagenasa, entre otras, productos extravasados de la sangre y por factores de crecimiento como el factor osteoinductor, osteogenina T, GF $\beta$ , FGf; etc. que tienen parte de su reservorio en la matriz ósea (8).

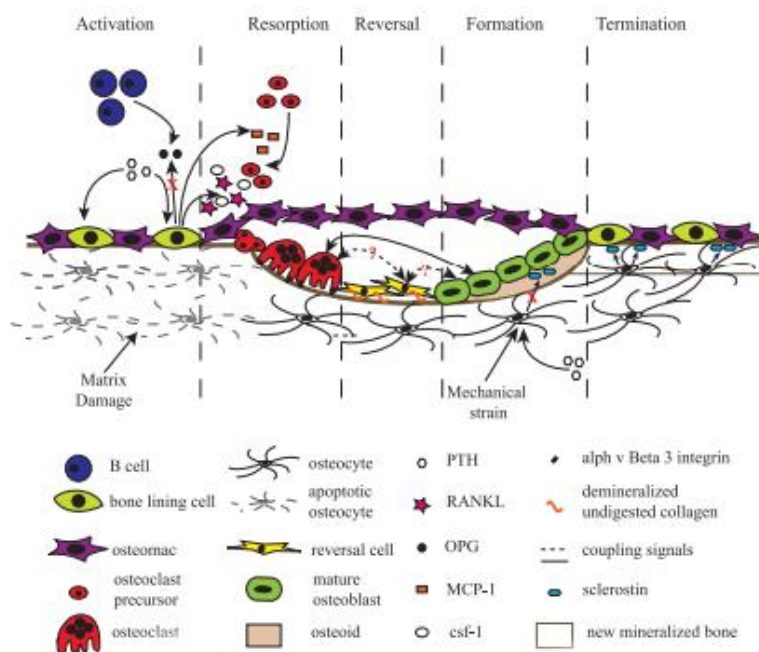
### 2.1.3 Dinámica ósea

El hueso está constantemente sometido a diferentes demandas funcionales, ante las cuales responde adaptándose mediante remodelación ósea. Este proceso corresponde al resultado de un equilibrio entre la formación ósea por osteoblastos y la resorción ósea por osteoclastos (Figura 2).

Este mecanismo de remodelación y resorción tienen lugar dentro de las cavidades óseas donde se lleva a cabo la formación de estructuras anatómicas temporales denominadas unidades básicas multicelulares (BMUs), que se componen de un grupo de osteoclastos por delante para formar el cono de corte y un grupo de osteoblastos detrás formando el cono de cierre, asociado a los vasos sanguíneos y a inervaciones periféricas. Se ha sugerido que BMU es rodeado por una cubierta celular (posiblemente células de revestimiento óseo) que forman el compartimiento de remodelación ósea (BRC). El BRC parece estar conectado a las células de revestimiento, que a su vez están en comunicación con osteocitos dentro de la matriz ósea (15).

La organización de las BMU en el hueso cortical y trabecular difieren, pero estas diferencias son principalmente morfológicas más que biológicas. Por otra parte en el hueso trabecular el proceso de remodelación es principalmente un evento de superficie y debido a que la relación superficie / volumen es mucho mayor, es más activo el proceso de remodelado que en el hueso cortical, con tasas de remodelación que pueden ser hasta 10 veces más altas (16).

#### 2.1.3.1 Fases de Remodelado Óseo



**Figura 2.** Esquema representativo de BMU y el ciclo de remodelado óseo. De Raggatt (17).

- Fase Quiescente

Es la primera fase del remodelado óseo y se relaciona con un estado de reposo, donde los factores desencadenantes aun no intervienen. En condiciones de reposo, los osteocitos mantienen en pausa expresan esclerostina, una molécula soluble que se une a LRP5 / 6 (relacionado con el receptor de lipoproteínas de baja densidad proteína-5/6) y evita directamente la señalización Wnt, un inductor de formación ósea (18).

- Fase de Activación

La etapa inicia con el reconocimiento de señales por parte de los osteocitos que dan pie al proceso de regeneración (19). Por ejemplo, una carga tensional mecánica sobre el hueso que genera una noxa estructural desencadenará la intervención de hormonas y señales que se activan en pos de mantener la homeostasis (17). Este estímulo lleva a una apoptosis de los osteocitos y desencadena el proceso de osteoclastogénesis (20). La hormona paratiroidea (PTH) activa un receptor acoplado a la proteína G transmembrana de las células osteoblásticas, estas a su vez activan la proteína quinasa A, quinasa C y vías de señalización intracelular de calcio, que inducen una cascada de señales transcriptoras y modulan el reclutamiento de precursores de osteoclastos e inducen su diferenciación (21).

- Fase de Reabsorción

Los osteoblastos activados producen la quimiocina MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1), favoreciendo el reclutamiento de precursores de osteoclastos inducido por RANKL (22). Además, la PTH también estimula la expresión de las citoquinas maestras de osteoclastogénesis, CSF-1 (factor estimulante de colonias de macrófagos), RANKL y OPG (osteoprotegerina), por parte de los osteoblastos. Se reduce la expresión de OPG y por el contrario CSF-1 y RANKL se incrementa para promover la formación de osteoclastos y su actividad posterior (23). CSF-1 y RANKL trabajan de manera coordinada, para promover la proliferación, diferenciación y actividad osteoclástica (24). Las metaloproteinasas de la matriz (MMP), son secretadas por los osteoblastos en respuesta a señales de remodelación mecánica y endocrina; degradan el osteoide no mineralizado que recubre la superficie del hueso y exponen los sitios de adhesión dentro del hueso mineralizado para facilitar la unión del osteoclasto. Estos se anclan a través de moléculas de integrina (25) para formar la zona de sellado, donde bombean iones de hidrógeno, produciendo un ambiente ácido que lleva a la disolución de la matriz mineralizada. De esta forma se constituyen las lagunas de resorción de Howship (26). Luego la matriz ósea orgánica restante es degradada por enzimas colagenolíticas con un pH bajo (en particular, catepsina K).

- Fase Reversa

Las lagunas de Howship permanecen cubiertas con matriz de colágeno desmineralizado no digerido. Una célula mononuclear de linaje indeterminado elimina estos remanentes de colágeno y prepara la superficie ósea para la posterior formación de hueso mediado por osteoblastos (27).

Los macrófagos asociados a la superficie ósea, residentes en el periódteo y el endóteo se denominan Osteomacs (“osteal macrophages”), y son los principales responsables de la eliminación de residuos de la matriz durante esta fase, pues son células fagocíticas por excelencia. Además, producen MMPs necesarias para la degradación de la matriz, y pueden producir osteopontina que se incorpora en el tejido mineralizado (28). El último papel de las células participantes durante la fase reversa es recibir o producir señales de acoplamiento que permiten la transición de la resorción ósea a la formación ósea dentro del BMU.

- Fase de Formación

La transición al proceso de formación ósea es llevada a cabo por varios mecanismos de acoplamiento, incluyendo la molécula soluble esfingosina 1-fosfato y la célula-EphB4 ephrin-B2 (complejo de señalización bidireccional) y son activados durante la resorción ósea. La esfingosina 1-fosfato secretada por osteoclastos, induce el reclutamiento de precursores osteoblásticos y promueve la supervivencia del osteoblasto maduro. La señalización avanzada a través de EphB4 en osteoblastos mejora la diferenciación osteogénica, y la señalización inversa a través de ephrin-B2 en precursores osteoclasticos suprime la diferenciación osteoclastica al inhibir la cascada osteoclastogénica-Fos/NFATc1 (28).

Este complejo de señalización EphB4 ephrin-B2 ofrece una oportunidad única para activar la formación e inhibir la resorción ósea simultáneamente, en este punto crítico de transición del proceso de remodelación (29).

Esta estimulación también puede ejercer señales de formación ósea a través de los osteocitos, inhibiendo la expresión de esclerostina, lo que permite la expresión de Wnt. Wnt dirige la formación ósea a través de su receptor y correceptor, LRP5 / 6. Esta vía de señalización anabólica es fundamental para establecer la densidad ósea basal (18). Sin embargo, los detalles de cómo la tensión mecánica y la señalización PTH ejerce efectos opuestos en las etapas iniciales y tardías de remodelación ósea fisiológica quedan por determinar y continúan siendo estudiadas (30).

- Fase de Terminación

La expresión de esclerostina se reactiva una vez que la cantidad de hueso reabsorbido y de hueso regenerado es igualada, concluyendo el ciclo de remodelación. Los osteoblastos maduros pueden sufrir apoptosis, volver a convertirse en un fenotipo de linaje óseo, o bien quedar embebidos en la matriz ósea y diferenciarse en osteocitos.

El ambiente de la superficie ósea en reposo se restablece y se mantiene hasta la próxima fase de remodelación (17).

## 2.1.4 Relación angiogénesis – osteogénesis

La angiogénesis es un proceso clave tanto en el desarrollo como en la regeneración ósea, necesaria para brindar nutrientes al hueso (31). Corresponde a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de redes vasculares preexistentes, mediada por una activación del endotelio y de células madre de la pared de los vasos sanguíneos (32).

Está estrechamente asociada al proceso de osteogénesis, y su interacción es controlada por una serie de factores autocrinos y paracrinos producidos por células osteoblásticas, endoteliales y sus precursores (33).

### **2.1.4.1 Angiogénesis durante la formación ósea**

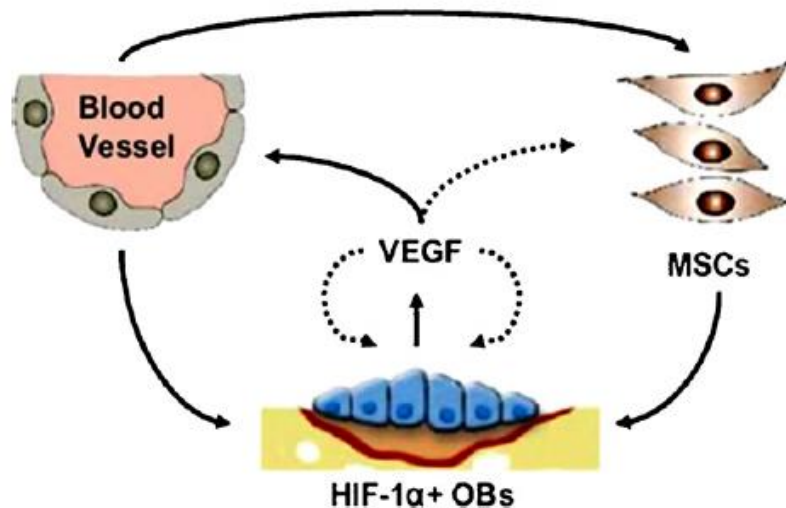
En cuanto a esta interacción en el proceso de formación ósea alveolar, en el estudio de An et al (34), se sugiere que la morfogénesis del hueso alveolar está íntimamente relacionada con la formación de vasos sanguíneos, ratificando estudios previos, que postulan que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el encargado de modular la diferenciación funcional de osteoblastos y fibroblastos, que formarán la arquitectura del periodonto (35–37).

La morfogénesis del hueso alveolar ocurre mediante osificación intramembranosa, que corresponde al proceso de desarrollo embrionario de huesos planos, como es la mandíbula. Ésta es fundamental tanto en el desarrollo de los huesos craneofaciales como para la ingeniería tisular de injertos óseos, y se basa fuertemente en la relación angiogénesis-osteogénesis. A diferencia de la osificación endocondral, donde la formación de hueso ocurre a partir de tejido cartilaginoso, la osificación intramembranosa ocurre dentro de una membrana de tejido conjuntivo. Las células osteoprogenitoras se reúnen en el área de osificación, donde la BMP regula la transcripción del factor Runx2, que desencadena la expresión de proteínas específicas, como BSP, osteocalcina y osteopontina, necesarias para producir la matriz mineralizada (38).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los reguladores más importantes de la angiogénesis y es crítico tanto para el desarrollo como para la regeneración ósea. En estos procesos el VEGF cumple un rol dual, actuando tanto en las células endoteliales para promover su migración y proliferación, como en la estimulación de la osteogénesis en la regulación de factores de crecimiento osteogénicos (39). Así, la angiogénesis y la osteogénesis están íntimamente relacionadas y deben estar estrechamente acopladas para la función fisiológica ósea.

Durante la regeneración ósea intramembranosa, la exposición a hipoxia en la fase inflamatoria inicial estimula la liberación de factores de crecimiento por parte de los osteoblastos, incluyendo VEGF, por la vía HIF-1 $\alpha$  (factor inducido por hipoxia), promoviendo migración y proliferación endotelial, y permeabilidad vascular (40). Los nuevos vasos aumentan el suministro de nutrientes, oxígeno y minerales necesarios

para la osteogénesis, y se encargan de reclutar células osteoprogenitoras al sitio de injuria. Además, las células endoteliales producen también factores osteogénicos (como BMP-2 y BMP-4), que promueven la diferenciación osteoblástica, mientras los osteoblastos diferenciados secretan factores angiogénicos (como PDGF-BB y VEGF) para sustentar aún más la angiogénesis mediante un feedback positivo (41,42), como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Relación osteogénesis-angiogénesis en hueso: los osteoblastos (OBs) liberan HIF-1 $\alpha$ , induciendo la regulación de VEGF, que estimula a las células madre mesenquimales (MSCs) y la invasión de vasos sanguíneos. De Riddle et al (33).

Un déficit en la angiogénesis puede ser la causa de un fracaso en la osteogénesis o en el proceso de reparación ósea. Esto se puede deber a problemas locales de vascularización o bien condiciones sistémicas del paciente, como diabetes. Gotz (43) propone que la cantidad de vasos sanguíneos se correlaciona con los resultados clínicos, al estudiar el aumento de cresta alveolar con materiales de regeneración ósea. Esto señala que la calidad angiogénica del tejido hospedero es importante, y debe ser evaluada cuidadosamente al planificar tratamientos regenerativos.

La angiogénesis es esencial en el proceso de reparación ósea, por la clara razón de que provee de nutrientes e intercambio gaseoso, además de constituir una vía de eliminación de productos de desecho. Los vasos sanguíneos además proveen sistemáticamente de factores circulantes que pueden modificar la cicatrización ósea, tales como PTH y vitamina D (44).

#### **2.1.4.2 Angiogenesis y regeneración ósea**

La vascularización también juega un papel crucial en la ingeniería tisular ósea, que busca el desarrollo de sustitutos óseos para reemplazar grandes pérdidas de tejido por trauma, cirugía u otras condiciones clínicas donde la cicatrización ósea fisiológica es insuficiente. De hecho, tras la implantación in vivo, un desafío importante para los sustitutos óseos de uso clínico es el mantenimiento de la viabilidad celular en el núcleo del injerto, que depende críticamente de la rápida invasión por los vasos sanguíneos del huésped. Una perfusión sanguínea escasa resulta en muerte celular debida a la falta de oxígeno, nutrientes y drenaje de desechos. Por otra parte, redes vasculares bien irrigadas también median el reclutamiento de células osteoprogenitoras, células madre hematopoyéticas y células inmunitarias, que juegan un rol importante en la regeneración y remodelación tisular (45).

Los principios fundamentales para aumentar la tasa de éxito de los tratamientos con materiales regenerativos son el mantenimiento del espacio, exclusión de la migración de tejido conectivo al sitio, la estabilización del coágulo sanguíneo, y el cierre primario del sitio quirúrgico (46). Además de estos principios quirúrgicos básicos, el suministro sanguíneo es otro factor crucial que provee los elementos nutricionales requeridos, oxígeno, células inmunitarias, células madre mesenquimales, y factores de crecimiento (4).

En la regeneración ósea, la angiogenesis juega un rol central, ya que provee la conexión funcional entre el material de injerto y los tejidos del huésped que lo rodean. Las redes vasculares bien establecidas y maduras favorecen y aceleran el proceso regenerativo (47).

Aunque actualmente se han investigado distintas estrategias para mejorar la vascularización de injertos osteogénicos, hasta ahora el éxito es más bien limitado. El esclarecimiento de la conexión molecular entre la angiogenesis y la osteogenesis es necesario para explotar el potencial terapéutico del VEGF y diseñar estrategias para mejorar tanto la vascularización eficiente como la formación de hueso (44).

## **2.2 Regeneración ósea alveolar**

### **2.2.1 Ingeniería de Tejidos**

La medicina regenerativa es definida como una disciplina que tiene por objetivo comprender los principios del crecimiento tisular, y aplicarlos en lograr el reemplazo de tejido funcional para uso clínico. En la cavidad oral se observa con gran frecuencia la pérdida de tejidos de soporte debida principalmente al edentulismo, es por esto que se ha trabajado en el desarrollo de materiales de regeneración ósea que no solo logren mimetizar en estructura el tejido óseo perdido sino también en función. Para el éxito de esta sustitución es necesario comprender la fisiología del tejido a reemplazar, que el material de injerto sea capaz de imitarlo y que se establezca una interacción funcional entre ellos (48).

Los materiales de regeneración ósea que se encuentran en el mercado tienen diversas propiedades y es importante poder discriminar cuál es la técnica más apropiada ante cada caso clínico. Se debe tener en consideración las características del sitio a injertar y el diagnóstico de cada caso, por otro lado, el origen del material de injerto, sus características, las posibles combinaciones entre ellos y con factores de diferenciación celular son variables a considerar en relación a la técnica para lograr la formación de nuevo tejido óseo (49).

### **2.2.2 Requerimientos de un material de injerto**

Los materiales de injerto tienen por objetivo lograr la regeneración ósea alveolar, a través de tres diferentes mecanismos: osteoconducción, osteoinducción, y osteogénesis. La osteoconducción es el proceso que proporciona un andamio bioinerte o matriz física, adecuada para la deposición de hueso nuevo en el hueso alveolar circundante y células mesenquimales diferenciadas para crecer a lo largo de la superficie del injerto (3). La osteoinducción en un injerto tiene lugar cuando el material induce la transformación de células madre mesenquimales indiferenciadas del huésped en osteoblastos o condroblastos mediante factores de crecimiento. La osteogénesis es la formación y el desarrollo de hueso, y ocurre cuando el injerto contiene osteoblastos u osteoprecursores viables que establecen nuevos centros de formación ósea (50).

### 2.2.3 Clasificación

Los materiales de injerto óseo se clasifican según su origen en autólogos, aloinjertos, xenoinjertos y aloplásticos. Todos ellos deben cumplir con uno o más de estos tres mecanismos de acción (46).

#### 2.2.3.1 **Autoinjertos**

Corresponde a tejido transferido de un sitio a otro del mismo individuo. Los sitios comunes de extracción pueden ser extraorales, tales como cresta iliaca, meseta tibial; o intraorales como sínfisis mandibular, tuberosidad maxilar, rama mandibular, entre otros. Son considerados materiales principalmente osteoconductivos con más de un 90% de éxito en la regeneración ósea (51). Es el gold estándar para tratar defectos óseos de menor tamaño (52). A pesar de mostrar excelentes resultados clínicos, la gran desventaja de los materiales autógenos es que implican una doble intervención, primero una cirugía de obtención y luego la cirugía de injerto propiamente tal. Las complicaciones asociadas con el procedimiento de extracción de hueso, al ser un procedimiento invasivo, incluyen infección de la herida, dolor persistente, hinchazón y sensación alterada, tanto en el sitio de extracción del injerto como en el de su colocación (53), por ello la necesidad de utilizar materiales que además de poseer potencial regenerativo propicien una cicatrización sin complicaciones que no interfiera en los mecanismos de regeneración ósea alveolar. También debemos considerar que no todos los pacientes son candidatos para este tipo de cirugía, que es necesario que el sitio donador del injerto cumpla con ciertas características como una buena calidad de hueso en tamaño y grosor, además de las condiciones sistémicas del paciente.

- Plasma Rico en Fibrina

Un grupo de materiales autógenos son los concentrados plaquetarios, donde encontramos el plasma rico en plaquetas (PRP) y plasma rico en fibrina (PRF). PRF es un concentrado de plaquetas de segunda generación desarrollado como un refuerzo para el PRP introducido en primera instancia (54). En el contenido del PRF podemos encontrar diversos elementos como fibrinas, plaquetas, citoquinas y leucocitos, además, en comparación con otros materiales biológicos, la preparación de PRF es bastante conveniente, ya que no se utilizan otros tratamientos bioquímicos para la sangre durante el proceso de producción. En términos de características biológicas, la fibrina desempeña un papel importante en la cicatrización del alvéolo, ya que el PRF es similar a los coágulos de sangre natural y favorece la agregación plaquetaria con factores de crecimiento (55).

Es un material biológico autólogo, viable y biocompatible descrito en primera instancia por Choukroun el año 2001 (56). Se utiliza frecuentemente para el tratamiento de defectos intraóseos o para técnicas como la elevación de seno, entre otros (57).

La clave de la regeneración tisular con PRF se encuentra en su potencial angiogénico, que no genera rechazo por parte del hospedero, y la capacidad para reclutar elementos celulares. Las propiedades angiogénicas pueden explicarse por la estructura tridimensional de la matriz de fibrina que contiene una serie de factores de crecimiento y citoquinas incorporados simultáneamente en la matriz que incluye PDGF, TGF- $\beta$ 1, IGF y VEGF (56,58).

Estudios previos han mostrado que este material permite la liberación lenta de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\beta$  (PDGF) y el VEGF, especialmente durante los primeros siete días (59). También se ha descrito que la liberación de factores continúa hasta alrededor de los 28 primeros días (60). PRF se puede utilizar como único biomaterial o en combinación con diferentes sustitutos óseos, lo cual optimizaría la regeneración ósea (59).

El PRF se mantiene estable dimensionalmente desde su aplicación clínica y comienza a degradarse lentamente liberando productos, los que estimulan directamente la migración de neutrófilos y provoca la secreción de proteasas que facilitan su penetración en la membrana basal de los vasos sanguíneos y contribuyen además en la degradación del coágulo de fibrina. Los neutrófilos atrapados dentro del coágulo de fibrina trabajan para eliminar las bacterias y los patógenos que ingresan al sitio de la herida por fagocitosis por lo que contribuye a la prevención de la contaminación bacteriana dentro del sitio quirúrgico. PRF también contiene macrófagos que participan en el proceso de curación y reparación, desempeñando un papel clave en la transición de inflamación a reparación de heridas durante la osteogénesis (61).

### **2.2.3.2 Aloinjertos**

Consiste en tejido que es transferido de un individuo a otro de la misma especie, pero genéticamente distinto. La ventaja de un aloinjerto es evitar una segunda intervención, disminuir el tiempo quirúrgico y la pérdida sanguínea, menor morbilidad del hospedero y un suministro ilimitado de material de injerto, por lo que su uso se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Es importante mencionar también sus desventajas: el tejido injertado se comportará como un antígeno en el hospedero y la exposición a transmisión de enfermedades a través de los injertos. Aunque se ha trabajado en las medidas necesarias para evitar la transmisión de enfermedades, se han reportado casos en los que se ha contagiado el virus de VIH (se presume que su contagio es de 1 en 1.6 millones) (62).

- Hueso Liofilizado

Tejido óseo humano particulado, almacenado y distribuido por bancos de hueso, los cuales posibilitan disponer de una mayor disponibilidad de hueso y sin la morbilidad de su extracción (63).

Inevitablemente, se plantea el riesgo de transmisión de enfermedades para los receptores de los aloinjertos, por lo que el reto de mantener los injertos seguros resulta esencial y es una premisa fundamental contar con un adecuado y fiable banco de huesos y tejidos (64).

Este aloinjerto se puede obtener de donantes vivos (resecado de la cabeza femoral durante la artroplastia total de cadera), donantes de múltiples órganos (hueso recolectado en la sala de operaciones) y donantes post-mortem (hueso recolectado en la morgue). Se debe tener en cuenta que la recolección aséptica por sí sola no hace que el tejido sea estéril, y que los antibióticos simples no eliminan los organismos bacterianos clínicamente significativos (65).

Uno de los pasos más importantes para reducir la inmunogenicidad y la transmisión de enfermedades es la presurización de fluidos para eliminar al máximo la médula ósea y desechos celulares. Posteriormente se somete a irradiación gamma en un nivel de irradiación adecuado para bacterias y esporas, aunque no necesariamente efectivo contra virus más resistentes.

En relación con la conservación, existen de dos formas: congelación y liofilización (secado en frío). La congelación del aloinjerto no afecta significativamente su resistencia mecánica, ni elimina los patógenos (66). El proceso de liofilización reduce la resistencia a la flexión y torsión del injerto, y los injertos liofilizados deben rehidratarse antes de su uso (64).

Tamaño de partícula: Al utilizar hueso liofilizado como material de injerto es importante considerar el tamaño de la partícula. Las partículas más grandes tienden a ser retenidas en el tejido óseo recién formado, debido al mayor tiempo requerido para su degradación o remodelación (67). En comparación con partículas más pequeñas (<1 mm), las partículas más grandes (1 mm) poseen una mayor resistencia mecánica, y proporcionan un volumen para mantener espacio, lo que es más importante para la formación ósea inicial (68).

Un estudio en elevación de seno maxilar indica que gránulos minerales de hueso bovino (xenoinjerto) con un tamaño que oscila entre 1–2 mm generó un volumen 1.4 veces mayor en el aumento que gránulos más pequeños 0.25–1 mm (69).

Porosidad: La presencia de poros o canales interconectados es la base para el uso de sustitutos óseos inorgánicos. El tamaño de poro (diámetro) debe ser de al menos 100  $\mu\text{m}$ , lo que permite la difusión de nutrientes para la supervivencia celular y la intrusión de la osteona mínima (70). Un tamaño de poro de 200–350  $\mu\text{m}$  ofrece condiciones óptimas para el crecimiento del hueso recién formado (71).

Es importante distinguir entre micro y macro porosidad. La microporosidad se define como poros  $\leq 10 \mu\text{m}$ ; esta característica ayuda a mejorar la adhesión celular, para permitir la permeabilidad de fluidos y nutrientes y así mejorar la bioactividad. Se define la macro porosidad como poros  $\geq 100 \mu\text{m}$ , que servirán para permitir la angiogénesis y el crecimiento de células óseas, imitando la porosidad del hueso trabecular, que tiene un valor medio de  $250 \mu\text{m}$ , aunque es muy variable. La interconectividad también es una propiedad importante para permitir permeabilidad, vascularización y crecimiento óseo (72).

La arquitectura y el diseño de un material de injerto influyen en la tasa de vascularización después de la implantación. Primero, el tamaño de poro del andamio es un determinante crítico de crecimiento de vasos sanguíneos. Drucke y col. mostró ese recipiente el crecimiento interno fue significativamente más rápido en andamios con poros mayor de  $250 \mu\text{m}$  que en aquellos con poros más pequeños (73). Sin embargo, no es solo el tamaño de poro lo que es importante para vascularización: la interconectividad de los poros también es importante porque la migración celular, y por lo tanto la vascularización, se inhibirá si los poros no están interconectados, incluso si la porosidad del andamio es alta (74,75).

### **2.2.3.3 Xenoinjertos**

Son tejidos obtenidos a partir de un individuo de distinta especie al hospedero. Los más representativos corresponden a la hidroxiapatita y matriz desorganizada de hueso bovino. Estos injertos son materiales inertes que proveen principalmente osteoconductividad, y sirven como matriz para la neoformación ósea y para mantener el volumen óseo. Gracias al perfeccionamiento de esta técnica se ha logrado obtener buenos resultados, como se observó en el estudio de Serrano et al (76), que compara las características clínicas e histológicas entre un xenoinjerto y un material autólogo y no se obtienen diferencias estadísticamente significativas.

### **2.2.3.4 Materiales aloplásticos**

Son biomateriales inertes sintéticos. Los más comunes son el carbonato de calcio, sulfato de calcio, polímeros de vidrio bioactivo y materiales cerámicos, incluyendo hidroxiapatita sintética y trifosfato de calcio. El mecanismo de acción de estos materiales es netamente osteoconductor; proveen una matriz estructural para una reparación y crecimiento óseo favorable. Los materiales biosintéticos son un aporte debido a que no generan una respuesta inmune por parte del paciente, sin embargo es esta misma característica la que en ocasiones hace dudar de su éxito, pues la falta de componentes biológicos genera un cambio en el pH del medio y perjudica la adhesión celular entre el material y el tejido circundante (62).

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es expresión de marcadores angiogénicos vWF y CD31 y osteogénicos OCN en hueso alveolar humano nativo y en hueso alveolar humano regenerado con un aloinjerto y PRF?

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 General**

Determinar mediante técnicas de inmunofluorescencia la expresión de marcadores angiogénicos vWF y CD31 y osteogénicos OCN de hueso alveolar nativo y hueso regenerado.

#### **4.2 Específicos**

Identificar componentes vasculares a través de marcadores endoteliales (vWF, CD31) tanto en hueso alveolar nativo como en hueso alveolar regenerado.

Definir actividad osteogénica a través de la expresión de un marcador osteogénico (OCN) tanto en hueso alveolar nativo como hueso alveolar regenerado.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Tipo de Estudio**

Diseño de estudio reporte de casos. Estudio descriptivo, observacional de tipo transversal.

### **5.2 Universo**

Se estudiaron muestras de hueso alveolar que recibieron tratamiento de regeneración ósea mediante elevación de seno maxilar, de pacientes que fueron sometidos a cirugía de implante dental, del Postgrado de Implantología Oral de la Universidad de Valparaíso, en el período entre Mayo y Octubre del año 2019. Las muestras fueron donadas voluntariamente previo consentimiento informado oral y escrito de los pacientes.

### **5.3 Criterios de inclusión y de exclusión**

#### **5.3.1 Criterios de inclusión**

- Muestras de pacientes que hayan firmado el consentimiento informado.
- Muestras de pacientes que cumplan con un rango etario de 40 a 60 años.
- Muestras de pacientes con indicación de implantes de diámetro mayor a 3.75 mm.

#### **5.3.2 Criterios de exclusión:**

- Muestras de pacientes con tiempo de regeneración menor a 6 meses.

## **5.4 Muestras**

### **5.4.1 Aprobación del estudio y Consentimiento informado**

El presente trabajo ha sido aprobado de acuerdo a los protocolos del Comité Institucional de Bioética de la Investigación en Seres Humanos de la Universidad de Valparaíso. La muestra procesada en este trabajo ha sido donada en forma voluntaria mediante consentimiento informado escrito y firmado, y consentimiento verbal del paciente.

### **5.4.2 Forma de selección**

Muestreo no probabilístico por conveniencia. Las muestras fueron recolectadas en las dependencias del Pabellón de Cirugía del Posgrado de Implantología Oral, en la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Estas se obtuvieron de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión. Fueron recolectadas en la cirugía de instalación de implantes entre el mes de Mayo y Octubre de 2019. Como se señala anteriormente, las muestras fueron donadas con el consentimiento informado verbal y escrito de los pacientes.

### **5.4.3 Unidad de estudio**

Muestras de hueso alveolar que contienen hueso nativo y hueso regenerado con material de aloinjerto y PRF.

## **5.5 Definición de las variables a estudiar**

### **Marcadores Angiogénicos:**

- Marcador de vWF: Variable cualitativa nominal dicotómica. Se medirá mediante la presencia/ausencia del anticuerpo anti-vWF.
- Marcador CD31: Variable cualitativa nominal dicotómica. Se identificará mediante la presencia/ausencia del anticuerpo anti-CD31.

### **Marcadores Osteogénicos:**

- Marcador de OCN: Variable cualitativa nominal dicotómica. Se identificará mediante la presencia/ausencia de inmuno-reactividad de la proteína Osteocalcina (OCN).

### **Variables demográficas:**

- Sexo: Variable cualitativa nominal dicotómica. Se medirá en femenino/masculino. Categorización visual entre presencia de mujer u hombre.
- Edad: Variable cuantitativa continua. Se medirá en años (0, 1, 2, 3...n). Tiempo cronológico de vida del sujeto medido en años al momento de la obtención de la biopsia.

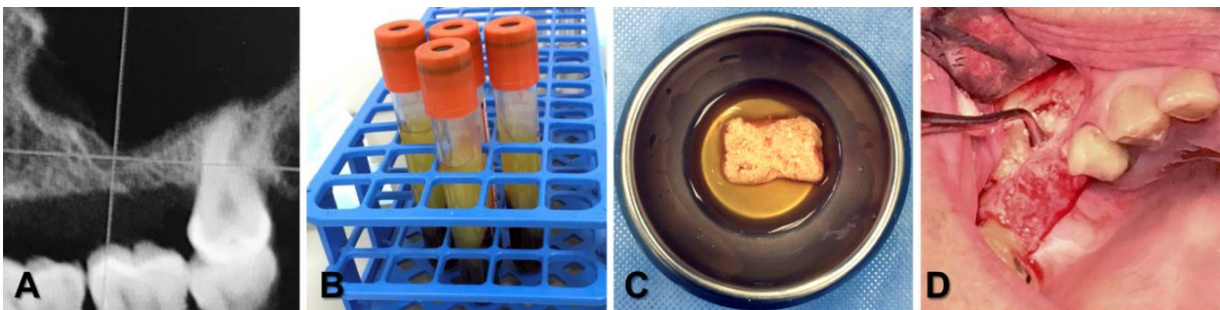
**Tiempo de regeneración:** Variable cuantitativa continua. Se medirá en meses (0, 1, 2, 3...n). Tiempo cronológico medido en meses desde el día de la cirugía de elevación de seno hasta el día de la obtención y recolección de la muestra, que corresponde a la cirugía de implante.

## **5.6 Proceso de recolección y procesamiento de la información**

### **5.6.1 Procedimientos Previos**

Se describe gráficamente el protocolo quirúrgico realizado de manera previa al estudio en la Figura 4. La técnica utilizada para regeneración ósea fue la elevación de seno maxilar, utilizando un injerto alógeno (hueso liofilizado de banco de hueso humano) en combinación con PRF en forma de Sticky Bone.

Para la preparación del Sticky Bone se obtuvieron 60 cc de sangre venosa del paciente, la cual se sometió a centrifugación de 3000 rpm durante 10 minutos. Se obtienen dos capas, de las cuales la más profunda es de elementos figurados, principalmente eritrocitos, y la capa superficial es fibrina. Esta se extrae luego con una jeringa y se mezcla con partículas de hueso liofilizado de banco humano; se dejó reposar durante 5-10 minutos para la polimerización, dando como resultado una masa que se compacta en el piso del seno maxilar.



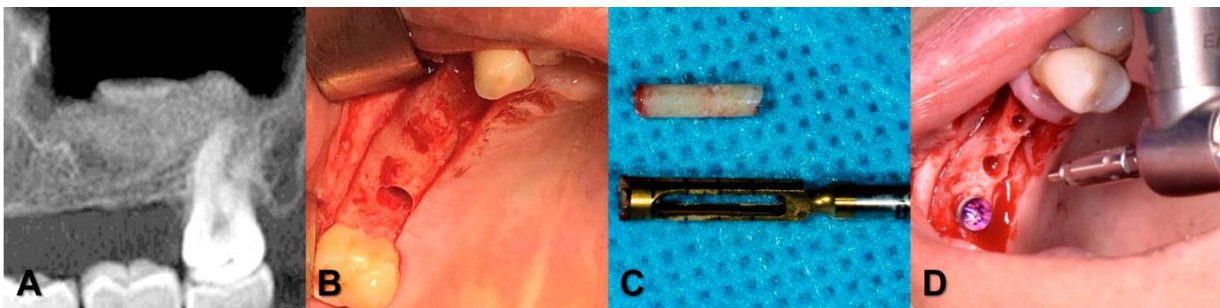
**Figura 4.** Protocolo quirúrgico previo. A) Radiografía del seno maxilar en condición inicial. B) PRF. C) Sticky Bone. D) Procedimiento de elevación de seno maxilar.

### 5.6.2 Recolección y procesamiento

El estudio se llevó a cabo a partir del seguimiento de 3 casos clínicos de pacientes que recibieron un tratamiento de regeneración ósea, para la posterior rehabilitación protésica mediante implantes dentales. Los pacientes fueron atendidos en el Posgrado de la Universidad de Valparaíso, en la Especialidad de Implantología Oral, entre los años 2018 y 2019. Todos ellos debían cumplir con una categorización de riesgo ASA I-II. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso, y luego de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, los pacientes firmaron un consentimiento informado antes de participar en el estudio.

Se obtuvieron biopsias de hueso alveolar durante la cirugía de implante (Figura 5), tras un periodo de 6-8 meses, utilizando una trefina de 3 mm de diámetro externo y 2 mm de diámetro interno (Hu Friedy, Chicago, Illinois, Estados Unidos), bajo anestesia local y previo a la colocación del implante. La toma de la biopsia fue llevada a cabo por Cirujanos Dentistas de la Especialidad de Implantología Oral. Luego de su obtención, la muestra es separada de la trefina con una pinza, y es depositada en un frasco rotulado con 20 ml de paraformaldehído. Los frascos fueron rotulados con código alfanumérico de la muestra y fecha correspondiente.

Una vez cumplido el tiempo de fijación las muestras fueron desmineralizadas en solución de EDTA al 4.13%, la que fue recambiada una vez por semana hasta los 21 días, para luego iniciar con los procesos de corte, inmunohistoquímica y microscopía óptica y confocal.



**Figura 5.** Protocolo quirúrgico de obtención de muestras. A) Radiografía del seno maxilar transcurridos 6 a 8 meses de la colocación del injerto. B) Sitio de la biopsia. C) Trefina de 2 mm de diámetro con muestra de hueso obtenida. D) Implante instalado.

## **5.7 Cortes**

Las muestras ya desmineralizadas fueron lavadas con solución buffer fosfato-salina (PBS) y sometidas a criopreservación en solución de PBS con sacarosa al 15% por dos horas para luego repetir esta etapa en igual solución al 30% por 24 horas. Las muestras embebidas en solución criopreservante fueron situadas en un medio de montaje para seccionamiento por congelación (Tissue-tek OCT Compound, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) y congeladas a -25°C. Se realizaron cortes de 25 micrones mediante una cuchilla Leica desechable 819, en un criostato (Leica CM-1900) operado a -25°C. Las secciones obtenidas fueron montadas en portaobjetos numerados previamente cargados con poli-lisina. Los cortes se almacenaron bajo refrigeración a 4°C. Secciones representativas fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina para caracterización y análisis de las muestras obtenidas.

## **5.8 Inmunofluorescencia e inmunomarcaje**

Para realizar los inmunomarcajes, las secciones montadas en portaobjetos fueron rehidratadas en PBS e incubadas por una hora en una solución de bloqueo (compuesta por 1% de albúmina de suero bobino (BSA), 1% suero de caballo y 0.3% Triton X-100 + solución PBS).

Luego se agregaron los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo y se dejaron actuar durante 12 h a una temperatura de 4°C. Los cortes fueron sometidos a cinco lavados de PBS de 10 min cada uno. Los anticuerpos secundarios también fueron diluidos en una solución de bloqueo (1:500) y luego de ser agregados se dejaron actuar durante 1 h a temperatura ambiente; por último son lavados con PBS. Finalmente los núcleos son marcados con DAPI (0.25 µg/ml) por 10 min. Las muestras fueron lavadas con PBS y cubiertas con medio de montaje (Dako Industries, Carpintería, CA, USA) para ser almacenadas en cajas plásticas a 4°C para su posterior análisis con microscopía.

Los cortes procesados fueron observados con microscopio confocal (Nikon C1 Plus y Zeiss Axion imager Z1), el cual opera con tres láser de distintas longitudes de onda de emisión (405, 488 y 555 nm). Los fluorocromos asociados a los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 488 goat anti-mouse en verde, Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit en rojo y DAPI en 405 nm en azul. Los registros digitales fueron procesados mediante los programas EZ-C1 3,90 (Nikon Corporation) e Image J (NH, Bethesda, MD, USA) para proyecciones de máxima intensidad. Para ajustes de brillo y contraste se utilizó el programa Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

## 5.9 Microscopía Óptica y Confocal

Los marcadores de inmunofluorescencia utilizados en el estudio se declaran en la Tabla II.

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>GEN</b>	<b>Host</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Marcación</b>
OCN	BGLAP	Ms/m	Millipore	Osteocalcina
CD31	PECAM 1	Ms/m	DAKO	Células endoteliales, leucocitos
vWF	VWF	Rb/m	DAKO	Células endoteliales
<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Fluorocromo</b>			
Anti-rabbit	Alexa Fluor 555 (Invitrogen)			
Anti-mouse	Alexa Fluor 555 (Invitrogen)			
Anti-mouse	Alexa Fluor 488 (Invitrogen)			
<b>DAPI</b>	Tinción de núcleos (0.25 µg/ml)			

**Tabla II.** Marcadores de inmunofluorescencia.

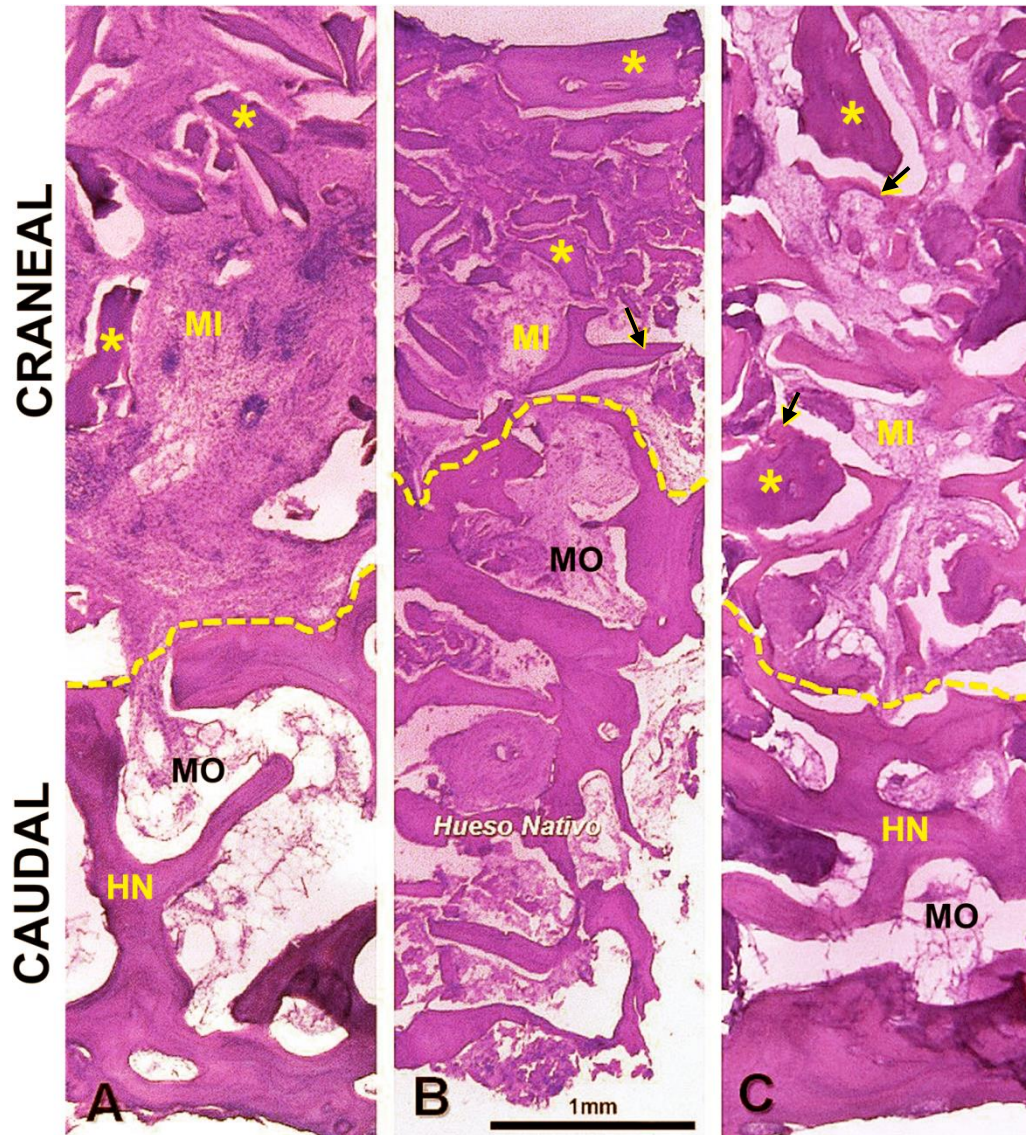
## 6. RESULTADOS

Los datos de los pacientes y las muestras recolectadas se presentan en la Tabla III.

Se obtuvieron cortes longitudinales de cada muestra de hueso alveolar, donde se distinguen tres zonas: caudal, craneal e interfase entre ambas (Fig.6). La zona caudal corresponde a hueso nativo o propio del paciente; la zona craneal contiene el tejido injertado, donde se evidencian partículas de hueso liofilizado y formación de matriz mineralizada; la interfase entre ambos sitios se señala esquemáticamente.

<b>Nº Paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>Tiempo de Regeneración</b>
1	M	52	6
2	F	53	8
3	M	54	7

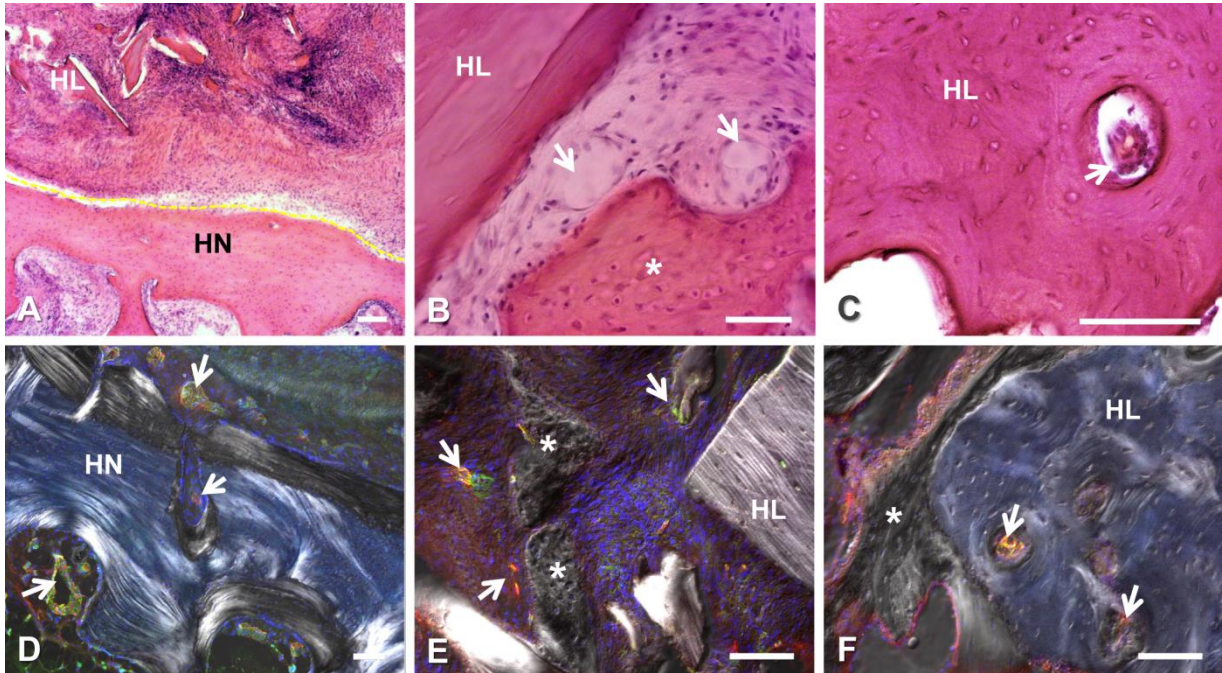
**Tabla III.** Datos demográficos de los pacientes. Se muestra el sexo (M/F), edad (años), tiempo transcurrido desde la elevación de seno hasta la toma de la biopsia (meses).



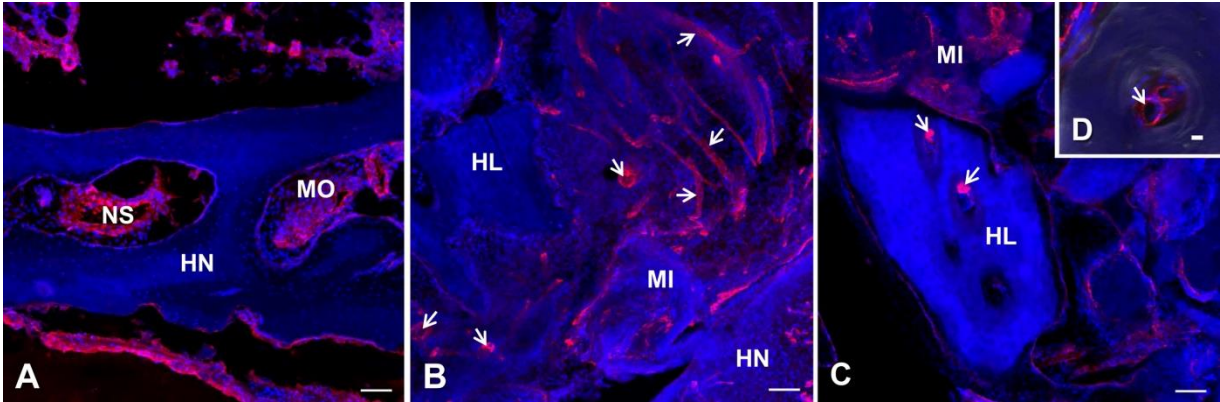
**Figura 6. Imágenes representativas de baja magnificación de cortes longitudinales de las muestras obtenidas (A-C).** En la base los cortes se observa la zona caudal de la muestra que compromete hueso nativo (HN) y espacios de médula ósea (MO). Las líneas amarillas segmentadas indican la transición entre hueso alveolar nativo y el sitio injertado que corresponde a la región craneal. Partículas de hueso liofilizado (asterisco) se evidencian interpuestas en la matriz del injerto (MI). Destaca la continuidad del trabeculado óseo nativo, el que contrasta con la dispersión y temprana integración de las partículas de hueso liofilizado y un hueso reticular incipiente (flechas). Tinción con Hematoxilina-Eosina (HE). Escala de barra= 1 mm.

## 6.1 Angiogénesis

Al analizar los cortes se evidenció la formación de nuevos vasos sanguíneos en cada una de las muestras, que se encuentran en relación tanto a la matriz del injerto como a las partículas de hueso liofilizado. Se describen en las Figuras 7 y 8.



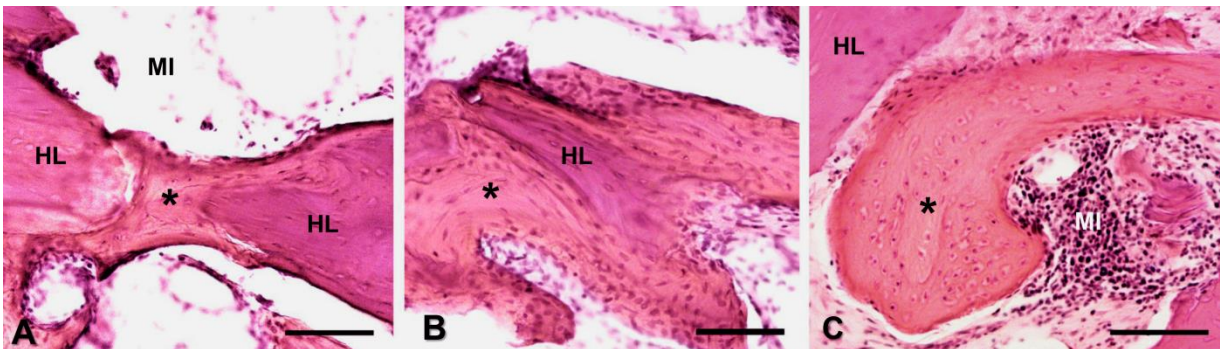
**Figura 7. Imágenes de microscopía óptica con tinción HE (A-C) y microscopía confocal con inmunomarcaje con anti-CD31 (verde) y anti-vWF (rojo) (D-F) de componentes vasculares en hueso nativo y regenerado mediante aloinjerto. A, D) Zona de interfase, donde se observa el hueso nativo (HN) con características de hueso trabecular maduro de organización laminar y parte del sitio injertado con presencia de partículas de hueso liofilizado (HL). Al inmunomarcaje se evidencian los vasos sanguíneos (flechas) presentes en el espacio medular del hueso nativo y en la zona de interfase con el hueso regenerado. B, E) Zona caudal, donde se observan vasos sanguíneos de distintos calibres en la matriz del injerto. Se encuentran en relación a partículas de hueso liofilizado y tejido osteoide (asterisco). C, F) Se aprecian partículas de hueso liofilizado en las que los conductos de Havers han sido invadidos por vasos sanguíneos. Escala de barras= 100  $\mu$ m.**



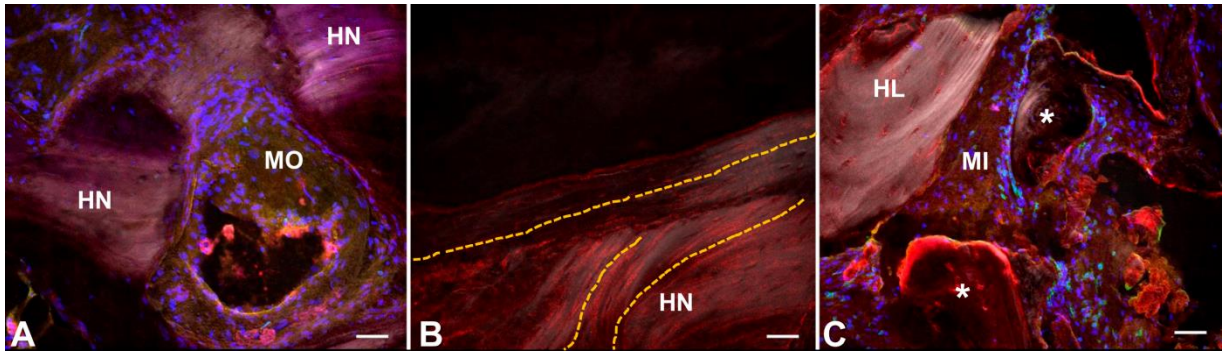
**Figura 8. Imágenes de microscopía confocal con inmunomarcaje con anti-vWF (rojo) de componentes vasculares de distintos calibres en hueso nativo y regenerado mediante aloinjerto. A)** Zona caudal de la muestra. Se observa hueso nativo (HN) con espacios trabeculares y la presencia de grandes vasos, correspondientes a nichos sinusoidales (NS) en la médula ósea (MO). **B)** Zona de interfase caudo-craneal. Se aprecia una extensa red vascular inmersa en la matriz del injerto (MI), se evidencian vasos de menor calibre (flechas) tanto en sección longitudinal como transversal. **C-D)** Zona craneal del injerto donde se observan vasos de pequeño calibre correspondientes a capilares que invaden los espacios de conductos de Havers de algunas partículas de hueso compacto liofilizado (flechas) inmersas en la matriz del implante (MI). Núcleos teñidos con DAPI (azul). HL, hueso liofilizado. Escala de barras A-C= 100 µm; D= 10 µm.

## 6.2 Osteogénesis

Se evidencian zonas de regeneración ósea en distintas etapas de maduración (Figura 9). A diferencia de la estructura del hueso nativo, éstas presentan una disposición desorganizada e irregular. Por otra parte, en las partículas de hueso liofilizado se observa una estructura laminar y la presencia de lagunas óseas vacías.



**Figura 9. Imágenes representativas con microscopía óptica de zona de regeneración ósea (A-C).** Corresponden a la zona craneal de las muestras analizadas. **A)** Una incipiente formación de hueso reticular regenerado (asterisco) evidencia la integración de partículas de hueso liofilizado. **B)** Perfil de hueso liofilizado secuestrado por la aposición de hueso regenerado (asterisco). **C)** Proceso de hueso regenerado de tipo reticular inmerso en la matriz del injerto (MI). HL, hueso liofilizado. Tinción HE. Escala de barras= 100 µm.



**Figura 10. Marcaje con inmunofluorescencia para anti-Osteocalcina (rojo) observado con microscopía confocal. A)** Magnificación de hueso nativo (HN) con espacios medulares (MO). **B)** Disposición laminar en hueso maduro de la interfase (líneas amarillas segmentadas). **C)** Perfiles de hueso trabecular regenerado (asterisco) y partículas de hueso liofilizado (HL). Núcleos teñidos con DAPI (azul). Escala de barras= 100µm.

Se puede observar una mayor expresión de osteocalcina en la estructura laminar del hueso nativo, siendo evidente en la organización ósea mostrada en la interfase entre hueso nativo y regenerado (Fig. 10B). Los espacios medulares del hueso nativo muestran elementos vasculares y celulares.

## **7. DISCUSIÓN**

La elevación de seno maxilar mediante injertos corresponde a una técnica desarrollada para aumentar la altura de hueso disponible para la colocación del implante en el maxilar posterior (77,78) corresponde a un terreno favorable por su alto porcentaje de éxito en regeneración, ya que ofrece sólidas paredes circundantes a las adherir el material de injerto, sumado a la presencia de la membrana de Schneider que otorga mayor estabilidad al material de injerto óseo, en comparación a otras técnicas de regeneración ósea alveolar (79).

La neoformación de vasos sanguíneos a partir de una red vascular preexistente juega un rol fundamental en la formación de hueso, aportando oxígeno, nutrientes y células progenitoras. La angiogénesis también regula el comportamiento óseo a través de interacciones directas las que son capaces de inducir la diferenciación de las células osteoprogenitoras (80). Esto es posible gracias a que la red vascular actúa como un andamio para células formadoras de hueso logrando una la intimidad las células endoteliales y los osteoblastos (81).

Los resultados de este estudio evidencian la vascularización del tejido injertado, que posibilita una conexión fisiológica entre el material de injerto y los tejidos circundantes del huésped, avalando estudios previos, como el de Saghiri et al. (4). Esto refuerza lo propuesto por Larsen et al. (82), quienes afirman que la angiogénesis en el sitio receptor es crítica para la supervivencia de los injertos óseos alogénicos.

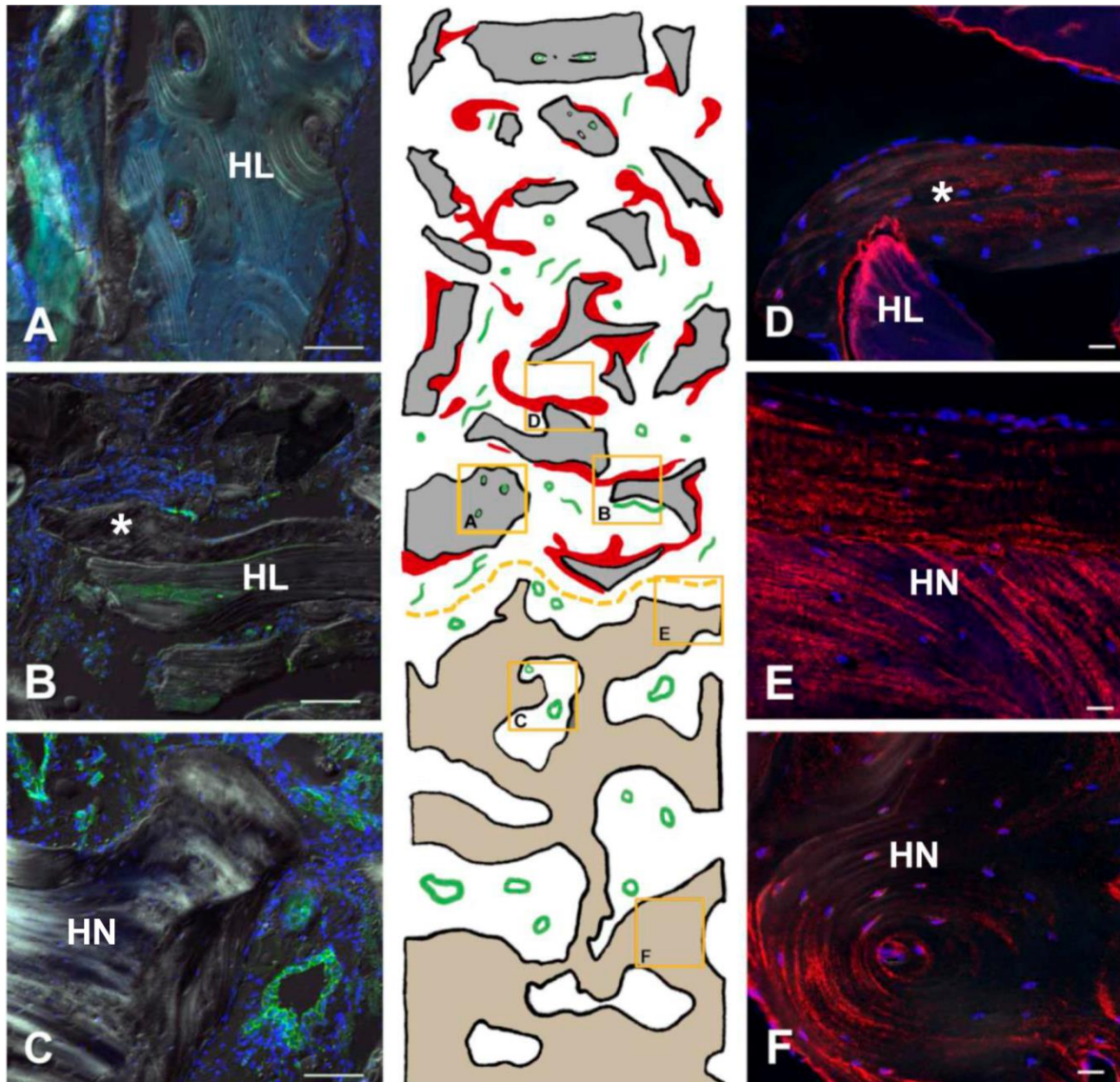
En todas las muestras obtenidas hemos identificado la presencia de vasos sanguíneos de distintos calibre según el sitio analizado. En relación al hueso nativo y en la zona más caudal del hueso nuevo se pueden observar vasos de mayor diámetro, que van disminuyendo hacia la zona más craneal.

Este proceso sumado a la liberación de factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF) aportados en primera instancia por el PRF y posteriormente por macrófagos reclutados, permiten tanto la angiogénesis como la osteogénesis, proceso que ocurre en relación a las partículas de hueso liofilizado o adyacente a estas mismas. También se aprecian vasos sanguíneos que han invadido espacios haversianos de partículas de hueso liofilizado con características de compacto. Todo esto reafirma la naturaleza osteoconductora del hueso liofilizado (3).

Las partículas de hueso liofilizado de los injertos analizados, evidencian diferentes tamaños y tipos de partículas (tanto de hueso trabecular como hueso cortical), características que influyen directamente en propiedades como resistencia mecánica y tiempo de degradación, haciendo menos predecible el comportamiento del material. Si bien estos parámetros no han sido evaluados en este estudio, son importantes para la regeneración ósea (49).

La literatura plantea que el tiempo mínimo requerido para regeneración ósea alveolar es de 6 meses (83) sin embargo, en las muestras estudiadas con tiempos de regeneración que oscilan entre 6 y 8 meses se observan más bien una regeneración incipiente, en las cuales es posible distinguir dos estadios tempranos en la

regeneración ósea, pudiendo identificar principalmente: tejido osteoide, que se observa en una etapa previa a la mineralización y con una organización aún amorfa; y un hueso reticular que corresponde a tejido óseo en formación (inmaduro), con calcificación y caracterizado por tener una matriz de fibras colágenas desorganizadas y presencia de osteocitos en relación a lagunas que varían en tamaño y disposición. En las muestras analizadas encontramos incipientes procesos de formación de hueso trabecular (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema representativo de corte longitudinal de una muestra observada al microscopio con baja magnificación, con imágenes representativas de inmunomarcaje obtenidas mediante microscopía confocal de componentes angiogénicos marcados con anti-CD31 (verde) (A-C) y osteogénicos marcados con anti-OCN (D-F). En color verde se han representado los vasos sanguíneos, en color rojo el hueso regenerado y en color gris el tejido óseo alveolar. Escala de barras= 100µm.

## Validez y Relevancia del Estudio

Las muestras fueron obtenidas en el pabellón quirúrgico y bajo las normas clínicas de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Los pacientes sometidos a cirugía fueron operados por profesionales pertenecientes a la especialidad de Implantología Oral. Todas las muestras fueron recepcionadas inmediatamente en el lugar de su obtención clínica y trasladadas de la misma manera a un único laboratorio donde fueron procesadas por el mismo operador. Para el correcto procesamiento de las muestras, se siguieron los protocolos de manera rigurosa en cuanto a los tiempos de fijación, descalcificación y aplicación de marcadores, según lo declarado en el apartado de Materiales y Métodos. Los instrumentos utilizados para su fijación, corte y análisis microscópico fueron previamente revisados para asegurar que se encontraran en óptimas condiciones y sin riesgo de fallas en la calibración y mantención. En cuanto a la cantidad de muestras obtenidas, el número de pacientes con indicación de cirugía de elevación de seno corresponde a un porcentaje menor del total de pacientes que son rehabilitados mediante implantes dentales, sin embargo el número de muestras es adecuado para presentar una serie de casos clínicos.

Debido a la amplia gama de materiales y técnicas utilizadas en la regeneración ósea maxilofacial (3,49), no es posible extrapolar los resultados de este estudio a toda la población sometida a tratamientos regenerativos, ya que se estudia una combinación de ciertos materiales de injerto en un sitio específico. Asimismo, el alcance de nuestra investigación se centra en hallazgos inmunohistológicos, lo que dificulta su comparación con una gran variedad de estudios cuyos resultados son principalmente clínicos y radiográficos.

Los hallazgos inmunohistológicos entregan información objetiva a nivel celular del tejido que se ha regenerado, los que complementados con resultados clínicos y radiográficos nos permiten comprender más a cabalidad la dinámica angiogénica y ósea en relación a los materiales de injerto. Si bien los tratamientos realizados tienen una alta tasa de éxito, la importancia de conocer las bases biológicas del proceso de regeneración ósea es que aportan un mayor grado de predictibilidad en el tratamiento rehabilitador. Así, en la medida que se establezcan protocolos y se realicen más estudios, como clínicos podremos realizar procedimientos quirúrgicos con pleno conocimiento del comportamiento de los materiales y características del tejido que se obtiene para el soporte del implante.

Como sugerencia para futuros estudios, creemos importante aumentar el número de muestras para lograr una mayor representatividad de la población de estudio, además de protocolizar la técnica quirúrgica (procedencia y marca del material, tipo de partícula y proporción, porosidad de la partícula, cantidad y volumen del material utilizado en la elevación de seno), estandarizar variables como tiempo de regeneración, calibración de los operadores (tanto en la cirugía de elevación de seno como en la toma de la biopsia). También complementar con otros tipos de mediciones como la estabilidad del implante (ISQ) que brinda mayor información respecto a la oseointegración por lo se requerirían estudios con un tiempo mayor de seguimiento.

## **Limitaciones**

- Falta de protocolo en el registro: a pesar de que se ha logrado recabar la misma información de cada paciente y que han sido fundamentales los registros obtenidos en fichas clínicas y Cone Beam facilitados por la Universidad, los informes imagenológicos no fueron obtenidos de la misma fuente con cada paciente, por lo que no fue posible lograr una exacta comparación ya que se utilizan distintos formatos para reproducir los Cone Beam y no se pueden observar los mismos cortes o desde el mismo ángulo.
- Falta de estandarización del operador: a pesar de que todas las cirugías se rigen bajo los mismos estándares y pabellón clínico, los pacientes que participaron en el estudio también se encuentran a cargo de diferentes cirujanos por lo que no todos los pacientes fueron sometidos a cirugía de elevación de seno maxilar por el mismo cirujano y no todas las muestras fueron obtenidas por el mismo operador.
- Cantidad de muestras: De acuerdo a la planificación inicial, el número de muestras obtenidas fue menor a lo esperado, ya que el grupo de pacientes sometidos a cirugía de elevación de seno fue limitado. Además, de ellos, un grupo aún más reducido coincidió en el tiempo de regeneración requerido con el plazo de recolección de muestras para nuestra investigación.

## **8. CONCLUSIÓN**

El uso de marcadores de inmunofluorescencia nos permitió determinar en todas las muestras componentes angiogénicos y osteogénicos.

Gracias a la expresión de marcadores vWF y CD31 presentes tanto en las muestras de hueso alveolar maduro como en las de hueso alveolar regenerado, se pudieron identificar componentes vasculares. Esto permite inferir que se produjo angiogénesis asociado al proceso de regeneración ósea alveolar.

Se ha logrado evidenciar el fenómeno de osteogénesis gracias a la expresión de OCN presente en tanto en las muestras de hueso alveolar maduro como en las de hueso alveolar regenerado.

## **9. RESUMEN**

**Introducción:** La pérdida dentaria desencadena una serie de cambios morfológicos asociados a una reabsorción ósea, fenómeno desfavorable en tratamientos de rehabilitación dental. Se han desarrollado numerosos materiales y procedimientos técnicos con el propósito de regenerar hueso alveolar. Una condición imprescindible durante el proceso de osteogénesis es el desarrollo de una vascularización que asegure el suministro de sangre y nutrientes. El presente estudio tiene como objetivo determinar la expresión de marcadores angiogénicos y osteogénicos en hueso alveolar humano nativo y regenerado.

**Materiales y Métodos:** Muestras de hueso alveolar de 3 pacientes sometidos a cirugía de implante dental, 6-8 meses post-tratamiento de regeneración ósea mediante técnica que combina aloinjerto (hueso liofilizado –HL-) con plasma rico en fibrina (PRF), en procedimientos de elevación de seno maxilar, fueron fijadas en PFA 4%, descalcificadas y procesadas para análisis con microscopía óptica y confocal. Marcadores angiogénicos (vWF, CD31) y osteogénicos (OCN) fueron ensayados.

**Resultados:** Cortes longitudinales de las muestras permiten diferenciar una zona caudal (hueso nativo) y una zona craneal (hueso regenerado). El análisis de marcadores angiogénicos en hueso nativo y regenerado evidencia cambios en calibre y distribución de nuevos vasos en proximidad a partículas de HL. A nivel craneal se observan perfiles de tejido osteoide y hueso reticular asociados a HL y formando una incipiente arquitectura trabecular OCN+.

**Discusión/Conclusión:** El presente estudio valida la actividad angiogénica y osteogénica en la técnica de aloinjerto +PRF. La microscopía confocal permite determinar en todas las muestras los marcadores angiogénicos y osteogénicos. Sugerimos nuevos estudios y tiempos de seguimiento.

## 10. REFERENCIAS

1. Gaengler P. Evolution of tooth attachment in lower vertebrates to tetrapods. In: Teaford MF, Meredith Smith M, Ferguson MWJ, editors. *Development, Function and Evolution of Teeth*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p. 173–85.
2. Monje A, Chan H-L, Galindo-Moreno P, Elnayef B, Suarez-Lopez del Amo F, Wang F, et al. Alveolar Bone Architecture: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol*. 2015; 86:1231-48.
3. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. *Open Dent J*. 2014; 8:56-65.
4. Saghiri MA, Orangi J, Asatourian A, Sorenson CM, Sheibani N. Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis part III: (Ti, Li, Ce, As, Hg, Va, Nb and Pb). *J Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016; 98:290-301.
5. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I, Alobera Gracia MA, Del Canto Pingarrin M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11: 47-51.
6. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. 2015; 1–17.
7. Chen H, Senda T, Kubo K ya. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol*. 2015; 48:61-8.
8. Gomez de ferraris M. *Histología, Embriología E Ingeniería Tisular Bucodental*. *Histol Embriol e Ing Tisular Bucodental*; Editorial médica Panamericana SA. 2009; 1:1-12.
9. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014; 561:3-12.
10. Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press; 1996. p. 51-67.
11. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: An endocrine cell... and more. *Endocrine Reviews*. 2013; 34:658–690.
12. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 1993; 8:505-10.
13. Vashishth D. Collagen glycation and its role in fracture properties of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005; 5:316.
14. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*. 2008; 61:577-87.
15. Parfitt AM. The bone remodeling compartment: A circulatory function for bone lining cells. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001; 16:1583–5.
16. Einhorn TA, Lee CA. Bone regeneration: new findings and potential clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg*. 2001; 9:157-65.

17. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285:25103–25108.
18. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2005; 280:19883–7.
19. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1116:281–290.
20. Heino TJ, Hentunen TA, Kalervo Vninen H. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor- $\beta$ : Enhancement by estrogen. *J Cell Biochem*. 2002; 85:185-97.
21. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*. 2002; 282:1-17.
22. Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack D V., Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem*. 2007; 282:33098-106.
23. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*. 2001; 142:4047-54.
24. Burgess TL, Qian YX, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999; 145:527-538.
25. McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Jonathan L, Novack D, et al. Mice lacking  $\beta 3$  integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest*. 2000; 105:433-40.
26. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000; 289:1504-8.
27. Everts V, Delaissié JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: Its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*. 2002; 17:77-90.
28. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*. 2006; 4:111-21.
29. Van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, Van Der Wee-Pals L, De Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin Is an Osteocyte-expressed Negative Regulator of Bone Formation, but Not a Classical BMP Antagonist. *J Exp Med*. 2004; 199:805–814.
30. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem*. 2008; 283:5866-75.
31. Bai Y, Yin G, Huang Z, Liao X, Chen X, Yao Y, et al. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering. *International Immunopharmacology*. 2013; 16:214–223.

32. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8:464–478.
33. Riddle RC, Khatri R, Schipani E, Clemens TL. Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in angiogenic-osteogenic coupling. *Journal of Molecular Medicine*. 2009; 87: 583–590.
34. An SY, Lee YJ, Neupane S, Jun JH, Kim JY, Lee Y, et al. Effects of vascular formation during alveolar bone process morphogenesis in mice. *Histochem Cell Biol*. 2017; 148:435-443.
35. Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 1996; 137:2262–2268.
36. Oshima A, Tanabe H, Yan T, Lowe GN, Glackin CA, Kudo A. A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation: Transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, Twist. *J Cell Biochem*. 2002; 86:792–804.
37. Yamamoto N, Otsuka T, Kondo A, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Kozawa O, et al. Rac limits TGF- $\beta$ -induced VEGF synthesis in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 15:35–41.
38. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in Bioscience*. 2007; 12:3068–3092.
39. Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009; 24, 1347–1353.
40. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor  $\alpha$  pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*. 2007; 117:1616–1626.
41. Duan X, Murata Y, Liu Y, Nicolae C, Olsen BR, Berendsen AD. Vegfa regulates perichondrial vascularity and osteoblast differentiation in bone development. *Dev*. 2015; 142:1984–1991.
42. Duan X, Bradbury SR, Olsen BR, Berendsen AD. VEGF stimulates intramembranous bone formation during craniofacial skeletal development. *Matrix Biol*. 2016; 52-54:127–140.
43. Götz W, Reichert C, Canullo L, Jäger A, Heinemann F. Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing - A brief overview. *Ann Anat*. 2012; 194:171-3.
44. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*. 2011; 42:556-61.
45. Grosso A, Burger MG, Lunger A, Schaefer DJ, Banfi A, Di Maggio N. It takes two to tango: Coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2017; 5:68.
46. Wang HL, Boyapati L. “pASS” principles for predictable bone regeneration. *Implant Dent*. 2006; 15:8-17.
47. Saghiri MA, Asatourian A, Garcia-Godoy F, Sheibani N. The role of angiogenesis in

- implant dentistry part II: The effect of bone-grafting and barrier membrane materials on angiogenesis. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*. 2016; 21:526-37.
48. Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2016; 122:392-402.
  49. Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol*. 2019; 46:82–91.
  50. Kale AA, Di Cesare PE. Osteoinductive agents. Basic science and clinical applications. *Am J Orthop*. 1995; 24:752-61.
  51. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: The reconstructive surgeon's point of view. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2006; 10:7-19.
  52. Sahoo NG, Pan YZ, Li L, He C Bin. Nanocomposites for bone tissue regeneration. *Nanomedicine*. 2013; 8:639-53.
  53. Yusof MFH, Zahari W, Hashim SNM, Osman ZF, Chandra H, Kannan TP, et al. Angiogenic and osteogenic potentials of dental stem cells in bone tissue engineering. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2018; 8:48–53.
  54. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006; 101:37-44.
  55. Pei T, Nie R, Yang G, Che Y, Zhang D, Zhou Y. A comparative study of early bone formation with PRF, bio-oss and osteoid hydroxyapatite after tooth extraction in rabbits. *J Hard Tissue Biol*. 2015; 24:29–36.
  56. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006; 101:299-303.
  57. Toffler M, Toscano DDSN, Holtzclaw MSD, Corso M Del, David DIU, Ehrenfest D. Introducing Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery Milieu. *Journal Implant Clin Dent*. 2009; 1:22–31.
  58. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006; 101:e45–e50.
  59. Zumstein M, Berger S, Schober M, Boileau P, W. Nyffeler R, Horn M, et al. Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) for Long-Term Delivery of Growth Factor in Rotator Cuff Repair: Review, Preliminary Results and Future Directions. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13:1196-206.

60. Wei L, Miron RJ, Shi B, Zhang Y. Osteoinductive and Osteopromotive Variability among Different Demineralized Bone Allografts. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015; 17:533-42.
61. Clark R. Fibrin and Wound Healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 936:355–367.
62. Chen FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. 2016; 53: 86–168.
63. Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts. What they can offer and what they cannot. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*. 2007; 89:574-579.
64. Ng VY. Risk of disease transmission with bone allograft. *Orthopedics*. 2012; 35:679-81.
65. Pruss A, Kao M, Gohs U, Koscielny J, Von Versen R, Pauli G. Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals*. 2002; 30:125-133.
66. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*. 2008; 20:86–100.
67. Prieto EM, Talley AD, Gould NR, Zienkiewicz KJ, Drapeau SJ, Kalpakci KN, et al. Effects of particle size and porosity on in vivo remodeling of settable allograft bone/polymer composites. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2015; 12:107.
68. Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res*. 2018; 62:152–61.
69. Testori T, Wallace SS, Trisi P, Capelli M, Zufetti F, Del Fabbro M. Effect of Xenograft (ABBM) Particle Size on Vital Bone Formation Following Maxillary Sinus Augmentation: A Multicenter, Randomized, Controlled, Clinical Histomorphometric Trial. *Int J Periodontics Restor Dent*. 2013; 33:467-75.
70. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2008; 26:434–41.
71. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31:461-6.
72. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. In: *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*. 2000; 21:2529-43.
73. Druce D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau H, et al. Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 68:10–8.
74. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*. 2001; 7:679-89.
75. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005; 26:5474-91.
76. Serrano Méndez CA, Lang NP, Caneva M, Ramírez Lemus G, Mora Solano G, Botticelli D. Comparison of allografts and xenografts used for alveolar ridge

preservation. A clinical and histomorphometric RCT in humans. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2017; 19:608-615.

77. Tatum H. Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dent Clin North Am* 1986; 30(:207–29.
78. Kaufman E. Maxillary Sinus Elevation Surgery: An Overview. *J Esthet Restor Dent.* 2003; 15:272–83.
79. Parra M, Olate S, Cantín M. Clinical and biological analysis in graftless maxillary sinus lift. *J Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2017; 214–20.
80. Roux BM, Cheng MH, Brey EM. Engineering clinically relevant volumes of vascularized bone. *J Cell Mol Med.* 2015; 19:903-14.
81. Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res.* 2006; 21:183–92.
82. Larsen M, Willems WF, Pelzer M, Friedrich PF, Dadsetan M, Bishop AT. Fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor mediated augmentation of angiogenesis and bone formation in vascularized bone allotransplants. *Microsurgery J.* 201; 34:301-7.
83. Steiner GG, Francis W, Burrell R, Kallet MP, Steiner DM, Macias R. The healing socket and socket regeneration. *Compend Contin Educ Dent.* 2008; 29:114-6,118,120-4.

## 11. ANEXOS

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES

El propósito del presente documento es invitarlo a participar en el estudio titulado “*Componentes angiogénicos y osteogénicos en regeneración ósea alveolar preimplante*”, cuyos investigadores principales son: Javiera Arévalo Berrocal, Patricio Astudillo Pérez, María Paz Espinosa Carmona, Alumnos de 6to año Odontología UV, en conjunto al docente guía Dr. Eduardo Couve Montane.

Para que usted pueda tomar una decisión informada, le explicaremos cuáles serán los procedimientos involucrados en la ejecución de la investigación, así como en qué consistiría su colaboración:

1. Dónde y cuándo se llevará a cabo la investigación: La investigación mencionada se realizará en Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso durante el año 2019
2. Relevancia del estudio y beneficios: Los estudios que apuntan al análisis de biomateriales de injerto óseo, sus efectos y beneficios en la formación de hueso alveolar como sustento de implantes oseointegrados, brindarán bases científicas para establecer procedimientos de preservación de hueso alveolar como rutina posterior a exodoncia, favoreciendo los tratamientos rehabilitadores. A futuro esto puede significar la inclusión de dichos procedimientos como políticas públicas, donde la comunidad se vería beneficiada con un mejor pronóstico y mayores posibilidades de rehabilitación oral. Se espera que los resultados obtenidos sean un aporte para la comprensión de la fisiología y los procesos biológicos del hueso alveolar y la regeneración ósea. Además, nos permite actualizar las técnicas de regeneración de hueso alveolar que se emplean en el área de la implantología, generando un beneficio tanto para los pacientes como para los clínicos de dicha área de la odontología.
3. Objetivos: observar en las muestras obtenidas la generación de nuevos vasos sanguíneos en hueso maduro y en hueso regenerado con ayuda de marcadores biológicos.
4. En qué consiste su participación: donar a nuestra investigación una muestra de hueso del sitio de colocación de implante.
5. Riesgos: el procedimiento se llevará a cabo en el pabellón de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, a cargo de cirujanos dentistas especialistas en implantología. No existe riesgo adicional al procedimiento quirúrgico como tal ni para la colocación del propio implante.
6. Costos y pagos: No supone un costo adicional para el paciente, ya que se realizará durante la intervención previa a instalación de implante dental.
7. Derechos del participante: El paciente puede solicitar información, buscar resolver dudas y resultados durante y después del estudio. Al final del documento se adjuntan los fonos de contacto de los investigadores.

8. Reserva de la identidad del participante: en ningún momento de la investigación se utilizará el nombre del paciente ya que las muestras serán codificadas (código alfanumérico) para su manipulación.
9. Confidencialidad de los datos: los datos serán de conocimiento solo de los investigadores y del docente guía de la investigación y serán almacenados en Laboratorio de Microscopía de Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.
10. Utilización y Publicación de los hallazgos: eventualmente los resultados de la investigación podrían ser utilizados y publicados para difusión de conocimiento de tipo académico-científicas, siempre asegurando confidencialidad de cada uno de los pacientes participantes.
11. Evaluación Comité Bioética y contacto: Esta investigación ha sido evaluada y aceptada por el Comité Ético Científico de Proyectos Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Si usted lo requiriera, puede contactar a alguno de sus integrantes a su secretaria, Prof. Claudia Cañete Hernández, al teléfono +56 32-2508500, o a través del mail institucional tesis.odontologia@uv.cl.
12. En caso de aceptar participar, recibirá un ejemplar de este documento.

Nombre Investigador: María Paz Espinosa Carmona  
Rut: 18.934.897-5  
Fono: +569 76673359  
Mail: maria.espinosac@alumnos.uv.cl

---

Firma

DECLARO que los investigadores Javiera Arévalo B. Patricio Astudillo P. María Paz Espinosa C. de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, ubicada en calle Subida Carvallo # 211 de la ciudad de Valparaíso, me han informado en forma completa en qué consiste la investigación "*Componentes angiogénicos y osteogénicos en regeneración ósea*

*alveolar preimplante*”, que llevarán a cabo en Laboratorio de Microscopía de la Facultad de Ciencias de Universidad de Valparaíso, y cuáles son los procedimientos a los que seré sometido/a, y en qué consistirá mi participación.

De acuerdo a lo explicado en el Consentimiento Informado, del que recibí una copia, entiendo que:

1. El objetivo de la investigación es observar en las muestras obtenidas la generación de nuevos vasos sanguíneos en hueso maduro y en hueso regenerado con ayuda de marcadores biológicos y se verán beneficiados tanto pacientes como clínicos del área de la implantología al generar nuevo conocimiento en esta área.
2. Mi participación es voluntaria y consistirá en donar a nuestra investigación una muestra de hueso del sitio previo a colocación de implante.
3. La investigación no ofrece riesgo extra o riesgo mayor al que compete un procedimiento quirúrgico en pabellón, el cual cumple con todos los protocolos en caso de inconvenientes durante la cirugía y la donación de la muestra se obtendrá antes de la instalación del implante.
4. Los datos obtenidos serán confidenciales, es decir, mi nombre no será dado a conocer, en su lugar, se utilizará un código alfanumérico y sólo podrán ser usados en alguna otra investigación cuyo objetivo no se aleje de los propósitos de este estudio.
5. Los resultados podrán ser divulgados en publicaciones de tipo académico-científicas, resguardando mi identidad. Además, entiendo que tendré acceso a los resultados, si yo lo requiriera.
6. No recibiré remuneración alguna por participar en este estudio y tampoco tendré que asumir gasto alguno.
7. Podré retirar mi participación si lo considerara necesario en cualquier momento sin que ello implique perjuicio alguno para mí.
8. Si me surgiera alguna duda, podré consultarla a investigadores en cualquier momento de la investigación, a quienes podré contactar en el fono +569 76673359.

\_\_\_\_\_  
Firma paciente

Valparaíso.....de 2019.