

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**ÓXIDO DE GRAFENO Y ÓXIDO DE GRAFENO CON CALCIO COMO ANDAMIOS
CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA: UN ESTUDIO HISTOLÓGICO EN RATAS**

**TRABAJO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN
ENDODONCIA**

PRESENTA

C.D. RAÚL RUIZ QUIRARTE

PRESIDENTE

(DIRECTOR DEL PROYECTO):

DR. MIGUEL ANGEL CADENA ALCÁNTAR

SINODAL

(CO-DIRECTORA)

DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL

(CO-DIRECTOR)

M.C. EDGAR RAMIRO MÉNDEZ SÁNCHEZ

SINODAL

(CO-DIRECTOR)

DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO GUTIERREZ

FACULTAD DE ODONTOLOGIA TIJUANA

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, BC junio de 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ÓXIDO DE GRAFENO Y ÓXIDO DE GRAFENO CON CALCIO COMO ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA: UN ESTUDIO HISTOLÓGICO EN RATAS**

Propuesto por el **C.D. Raúl Ruiz Quirarte**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional

A T E N T A M E N T E

Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántar

**PRESIDENTE
(DIRECTOR DEL PROYECTO)**

Ccp. – Archivo

FACULTAD DE ODONTOLOGIA TIJUANA

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, BC junio de 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ÓXIDO DE GRAFENO Y ÓXIDO DE GRAFENO CON CALCIO COMO ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA: UN ESTUDIO HISTOLÓGICO EN RATAS**

Propuesto por el **C.D. Raúl Ruiz Quirarte**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional

A T E N T A M E N T E

Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez
SINODAL
(CO-DIRECTORA DEL PROYECTO)

Ccp. – Archivo

FACULTAD DE ODONTOLOGIA TIJUANA

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, BC junio de 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ÓXIDO DE GRAFENO Y ÓXIDO DE GRAFENO CON CALCIO COMO ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA: UN ESTUDIO HISTOLÓGICO EN RATAS**

Propuesto por el **C.D. Raúl Ruiz Quirarte**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional

A T E N T A M E N T E

Dra. Eva Viviana Sarmiento Gutiérrez
SINODAL
(CO-DIRECTORA DEL PROYECTO)

Ccp. – Archivo

FACULTAD DE ODONTOLOGIA TIJUANA

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

Tijuana, BC junio de 2019

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ÓXIDO DE GRAFENO Y ÓXIDO DE GRAFENO CON CALCIO COMO ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA: UN ESTUDIO HISTOLÓGICO EN RATAS**

Propuesto por el **C.D. Raúl Ruiz Quirarte**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

Por lo que el sustentante puede continuar con el proceso del examen recepcional

A T E N T A M E N T E

M.C. Edgar Ramiro Méndez Sánchez
SINODAL
(CO-DIRECTOR DEL PROYECTO)

Ccp. – Archivo

OXIDO DE GRAFENO Y GRAFENO CON CALCIO COMO ANDAMIO CELULAR PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA: UN ESTUDIO HISTOLÓGICO EN RATAS

PRESENTA

C.D. Raúl Ruiz Quirarte

DIRECTOR

Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántar

CO-DIRECTORES

Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez

M.C. Edgar Ramiro Méndez Sánchez

Dra. Eva Viviana Sarmiento Gutiérrez

Tijuana, Baja California, junio del 2019

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	12
1. RESUMEN	16
1.1 ABSTRACT	17
2. INTRODUCCIÓN	18
2.1 Huesos y tejido óseo	19
2.2 Andamios en ingeniería de tejidos	24
2.3 Andamios Poliméricos	25
2.4 Cerámicas	27
2.5 Compositos	28
2.6 Grafeno	29
2.6.1 Características generales y propiedades del grafeno	33
2.6.2 Propiedades eléctricas	33
2.6.3 Permeabilidad	34
2.6.4 Propiedades mecánicas y elasticidad	34
2.6.5 Otras propiedades	34
2.6.6 Toxicidad	34
2.6.7 Diferenciación de células madre	35
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
5. HIPÓTESIS	38
5.1 Hipótesis de trabajo	38

CONTENIDO

5.2 Hipótesis nula	38
5.3 Hipótesis alternativa	38
6. OBJETIVOS	39
6.1 Objetivo general	39
6.2 Objetivos específicos	39
7. VARIABLES	40
7.1 Variables independientes	40
7.2 Variables dependientes	40
8. MATERIALES Y METODOS	41
8.1 Reactivos químicos	41
8.2 Equipo	41
8.3 Animales	41
8.4 Metodología	41
8.4.1 Procedimiento quirúrgico	41
8.4.2 Sacrificio de los animales en experimentación y obtención de biopsias	42
8.4.3. Análisis histológico de las muestras obtenidas	43
9. RESULTADOS	47
9.1 Ejecución del defecto óseo y aplicación del injerto en las ratas de experimentación	47
9.2 Monitoreo de los animales post cirugía	48
9.3 Obtención de biopsias	48
9.4 Análisis histológico de las muestras obtenidas	49
9.4.1 Grupo I (9 días)	49
9.4.2 Grupo II (21 días)	53

CONTENIDO

9.4.2 Respuesta inmunológica	62
10. DICUSIÓN	66
12. AGRADECIMIENTOS	72
13. BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del periostio.

Figura 2. Mediadores celulares en la formación de tejido óseo.

Figura 3. Representación esquemática del proceso de formación de tejido óseo.

Figura 4. Proceso de remodelación del hueso.

Figura 5. Aplicaciones de grafeno en ingeniería de tejidos.

Figura 6. Esquema de la obtención y estructura de las diferentes formas del grafeno a partir de grafito.

Figura 7. Espectro Raman de pristine grafeno (espectro superior) y sus derivados: óxido de grafeno (GrO) y óxido de grafeno reducido (rGrO) (espectro inferior).

Figura 8. Representación esquemática de la metodología para aplicación del injerto en el modelo animal.

Figura 9. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina a las que fueron sometidas as muestras de tejido óseo.

Figura 10. Procedimiento quirúrgico.

Figura 11. Localización de los defectos y colocación de injertos.

Figura 12. Procedimiento para la obtención de muestras óseas.

Figura 13. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R4C-9**.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 14. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R4GrO-9**.

Figura 15. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R5GrO-9**.

Figura 16. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R5GrOCa-9a**.

Figura 17. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R1C-21**.

Figura 18. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R1GrO-21**.

Figura 19. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R2C-21**.

Figura 20. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R2GrO-21**.

Figura 21. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R3C-21**.

Figura 22. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R3GrOCa-21**.

Figura 23. Micrografía de tejido conectivo muestreado de **R4C-21** a 400x.

Figura 24. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R4GrOCa-21**.

Figura 25. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R5GrO-21**.

Figura 26. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R5GrOCa-21**.

Figure 27. Recuento de las células del linaje inmunológico (9 días).

Figure 28. Recuento de las células del linaje inmunológico (21 días).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 29. Indicadores la respuesta inmune (Tinción con hematoxilina y eosina) en las muestras de tejido óseo procesadas a los 9 días..

Figure 30. Indicadores de la respuesta inmune (Tinción con hematoxilina y eosina) en las muestras de tejido óseo procesadas a los 21 días.

Figura 31. Estructura del óxido de grafeno (GrO) y óxido de grafeno calcio (GrOCa).

Tabla 1. Protocolo del procesamiento en parafina de las muestras de tejido óseo en el procesador de tejido modelo SP-120.

Tabla 2. Resumen de los indicadores relacionados al proceso inflamatorio observadas en las muestras de tejido óseo teñidas con hematoxilina y eosina.

Imagen 1. Imagen de un corte longitudinal de la epífisis de un hueso largo.

1. RESUMEN

Objetivos: El objetivo de la presente investigación fue analizar histológicamente el efecto del uso de Óxido de grafeno y Óxido de grafeno con Calcio como reconstructor óseo en defectos óseos creados quirúrgicamente en cráneos de rata.

Material y métodos: Se crearon defectos óseos quirúrgicos de tamaño crítico (4mm) en 10 animales que se dividieron aleatoriamente en dos grupos: grupo I (9 días); grupo II (21 días); Los animales fueron sacrificados a los 9 o 21 días después de la cirugía. Las muestras se incluyeron en parafina, se cortaron en serie y se tiñeron con hematoxilina y eosina para su análisis bajo microscopía óptica. La formación de hueso nuevo en el área cortical del defecto se evaluó visualmente y se capturaron datos mediante un cuestionario previamente elaborado.

Resultados: Todos los grupos experimentales demostraron una curación ósea superior en comparación con el grupo control. Sin embargo, las muestras experimentales del grupo II mostraron evidencia de una curación más avanzada después de la cirugía en comparación con los grupos experimentales del grupo I.

Conclusiones: El Óxido de grafeno y el Óxido de grafeno con Calcio como injerto óseo para restauración produjo mejores resultados de tratamiento en comparación con los grupos Controles (Defecto quirúrgico únicamente) en el caso de defectos de tamaño crítico en cráneos de rata. Los biomateriales utilizados en combinación con técnicas de ingeniería de tejidos han mostrado resultados alentadores con respecto a la formación de hueso nuevo

1.1 ABSTRACT

Objectives: the objective of the present investigation was to analyze histologically the effect of the use of graphene oxide and graphene oxide with calcium as a bone reconstructive in bone defects surgically created in rat skulls.

Material and methods: surgical bone defects of critical size (4mm) were created in 10 animals that were randomly divided into two groups: group i (9 days); group ii (21 days); the animals were sacrificed 9 or 21 days after surgery. The samples were included in paraffin, serially cut and stained with hematoxylin and eosin for analysis under light microscopy. The formation of new bone in the cortical area of the defect was visually evaluated and data were captured through a previously prepared questionnaire.

Results: all the experimental groups showed superior bone healing compared to the control group. However, the experimental samples of group ii showed evidence of a more advanced cure after surgery compared to the experimental groups of group i.

Conclusions: graphene oxide and graphene oxide with calcium as a bone graft for restoration produced better treatment results compared to the controls groups (surgical defect only) in the case of critically sized defects in rat skulls. Biomaterials used in combination with tissue engineering techniques have shown encouraging results with respect to the formation of new bone

2. INTRODUCCIÓN

Endodoncia es la rama de la odontología encargada del estudio de la morfología de la cavidad pulpar, la fisiología y la patología de la pulpa dental, así como la prevención y eliminación de las alteraciones pulpares y sus repercusiones sobre los tejidos perirradiculares ⁽¹⁾.

El ámbito clínico de la endodoncia incluye el diagnóstico y el tratamiento del dolor orofacial de origen pulpar y/o periapical; los tratamientos para mantener la vitalidad de la pulpa; los tratamientos de conductos radiculares cuando no es viable conservar su vitalidad o cuando existe necrosis de la misma; los tratamientos quirúrgicos para eliminar los tejidos periapicales inflamados, consecuencia de la patología pulpar; el tratamiento de la afectación pulpar por traumatismos, así como reimplante de dientes avulsionados; y el retratamiento de dientes que presentan un fracaso de un tratamiento endodóntico previo ⁽²⁾.

Los defectos óseos grandes representan problemas clínicos importantes. La pérdida ósea puede ser el resultado de varias patologías, causadas por un traumatismo, o puede ser una consecuencia de procedimientos quirúrgicos. Varias investigaciones han evaluado la reconstrucción de estructuras anatómicas perdidas debido a un traumatismo, infección o resección de tumores, para proporcionar rehabilitación funcional y estética del paciente. Los biomateriales utilizados en combinación con técnicas de ingeniería de tejidos han mostrado resultados alentadores con respecto a la formación de hueso nuevo. La Ciencia de los Biomateriales comprende el estudio de aquellos materiales diseñados para interactuar con sistemas biológicos y resolver problemas muy diversos en el área de Biomedicina ⁽³⁾.

La restauración con apoyo de implantes ha sido realizada cada vez más por dentistas por razones tanto estéticas como funcionales. Sin embargo cuando Infecciones, procesos patológicos, extracciones o lesiones congénitas y traumáticas en

el maxilar superior y la mandíbula conducen a la pérdida ósea, la instalación del implante dental podría no ser la mejor opción ⁽⁴⁾. Por lo tanto, para minimizar la pérdida de hueso alveolar, o incluso restaurarla, diferentes tipos de se han utilizado injertos aloplásticos.

La restauración con apoyo de implantes ha sido realizada cada vez más por dentistas por razones tanto estéticas como funcionales. Sin embargo cuando las infecciones, procesos patológicos, extracciones o lesiones congénitas y traumáticas en el maxilar superior y la mandíbula conducen a la pérdida ósea, la instalación del implante dental podría no ser la mejor opción ⁽⁵⁾. Por lo tanto, para minimizar la pérdida de hueso alveolar, o incluso restaurarla, diferentes tipos de injertos aloplásticos se han desarrollos por ingeniería de tejidos.

2.1 Huesos y tejido óseo

Un hueso está compuesto típicamente por tejido óseo y otros tejidos conjuntivos, incluidos el tejido hemopoyético y el tejido adiposo, junto con vasos sanguíneos y nervios ⁽⁶⁾. El tejido óseo se clasifica en compacto (denso) y esponjoso (trabeculado). Al examinar la superficie de corte de un hueso se pueden identificar dos organizaciones estructurales distintas del tejido óseo. Una capa densa y compacta forma la superficie ósea externa (*tejido óseo compacto*) mientras que una malla de aspecto esponjoso compuesta por trabéculas (delgadas espículas de tejido óseo anastomosadas) forma la parte interna del hueso (*tejido óseo esponjoso*). Los espacios que hay en la malla están comunicados y, en los seres vivos, contienen la médula y vasos sanguíneos ⁽⁶⁾.

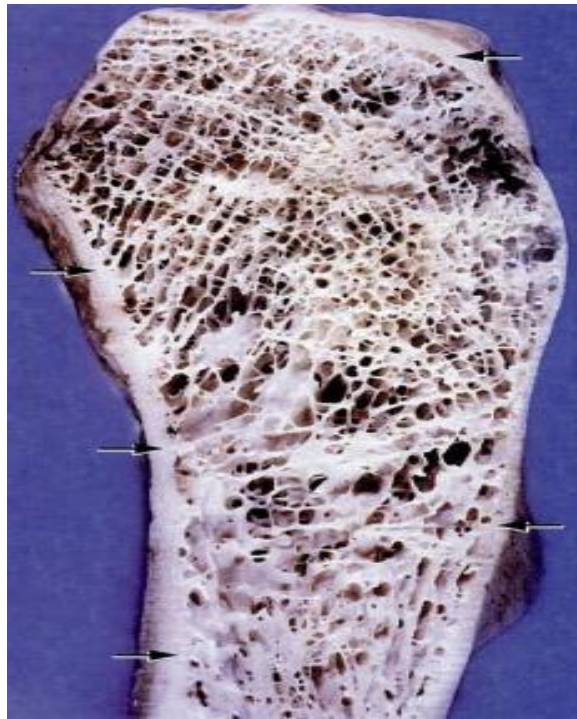


Imagen 1. Imagen de un corte longitudinal de la epífisis de un hueso largo. Imagen tomada de: ROSS MH y WP. Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.

La Imagen 1 muestra un corte longitudinal de la epífisis de un hueso largo. La porción más externa tiene una estructura maciza (flechas) y corresponde al hueso compacto (denso). El interior del hueso es de aspecto reticulado y corresponde al hueso esponjoso (trabeculado), que está formado por muchas trabéculas óseas anastomosadas entre las cuales hay un laberinto de espacios medulares intercomunicados ⁽⁶⁾

Los huesos están formados primordialmente por tejido óseo, aunque éste está acompañado por tejido conectivo propiamente dicho y por tejido cartilaginoso. El tejido conectivo forma el periostio y el endostio, membranas que revisten las superficies externa e interna de los huesos, respectivamente.

El endostio está formado por tejido conectivo, con abundantes vasos sanguíneos, células osteogénicas y osteoblastos. En el adulto, contiene células

inactivas que conservan la capacidad osteogénica en caso de lesión ósea para su reparación. El endostio, también tiene capacidad osteogénica.



Figura 1. Esquema del periostio. El periostio es la membrana que rodea al hueso por cartílago articular. El periostio está compuesto por dos capas: capa exterior fibrosa formada por tejido conjuntivo denso irregular que contiene los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios que pasan al hueso; y la capa osteogénica que contiene células óseas de varios tipos, fibras elásticas y vasos sanguíneos. Figura tomada de http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_10.htm

Las células formadoras del tejido óseo son los osteoblastos (Figura 2). Los osteoblastos segregan los componentes de la matriz extracelular (MEC). La matriz extracelular recibe el nombre de sustancia osteoide y contiene proteoglicanos, glicoproteínas y abundantes fibras colágenas (Figura 3). Los osteoblastos depositan sobre las fibras colágenas las sales de hidroxiapatita (fosfato de calcio) que mineralizan el hueso, otorgándole rigidez. Gran parte del calcio y del fosfato del organismo se encuentran en el tejido óseo. Cuando las células quedan completamente rodeadas por la MEC, reciben el nombre de osteocitos (Figura 2). Éstas presentan un cuerpo central, donde se ubican el núcleo y la mayor parte del citoplasma, y prolongaciones delgadas que les dan un aspecto arañeiforme (forma de araña). Las prolongaciones de los osteocitos se extienden por el interior de canaliculos que quedan excavados en la sustancia intercelular y (Figura 3), a través de los mismos, distintos osteocitos pueden conectarse entre sí ⁽⁶⁾.

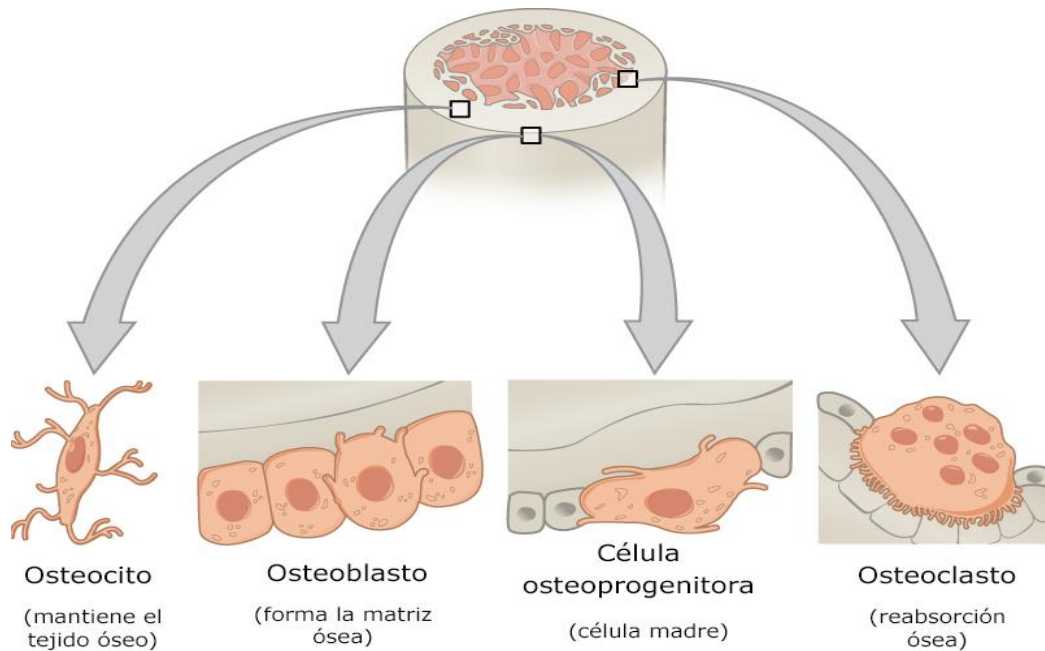


Figura 2. Mediadores celulares en la formación de tejido óseo. Ilustración de las células implicadas en la formación de hueso: osteocitos, osteoclastos, célula osteoprogenitora y osteoclasto. Figura tomada de: Tortora-Derrickson: *Principios de Anatomía y Fisiología*.

El tejido óseo es metabólicamente muy activo. Los huesos crecen durante la infancia y la adolescencia y realizan una continua actividad de remodelación a lo largo de la vida. La remodelación está influida por la actividad física desarrollada. El crecimiento y la remodelación de los huesos resultan de la acción combinada de los osteoclastos y los osteoblastos ⁽⁶⁾.

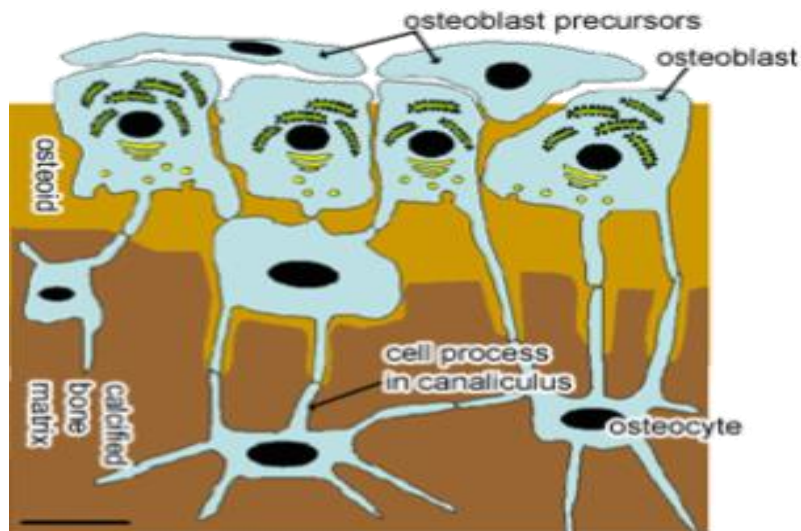


Figura 3. Representación esquemática del proceso de formación de tejido óseo. Figura

tomada de: https://www.histology.leeds.ac.uk/bone/bone_cell_types.php.

Los osteoclastos son células de gran tamaño (Figura 2), multinucleadas, formadas por la fusión de monocitos provenientes de la médula ósea y con un elevado contenido de enzimas lisosómicas. Cuando un hueso va a ser remodelado, (Figura 4) los osteoclastos aparecen sobre la superficie del mismo. Interactúan con la MEC a través de una superficie secretora plegada (ribete en cepillo) liberando ácidos y enzimas que provocan la degradación de sus componentes. Este proceso se denomina resorción ósea. El crecimiento de los huesos requiere resorción de algunas partes a cargo de los osteoclastos, y formación de nueva matriz, a cargo de los osteoblastos ⁽⁶⁾.

Después de una fractura, el hueso se autorrepara repitiendo el proceso embrionario original. Para ello, requiere un modelo de cartílago en la zona de fractura. Las células cartilaginosas se diferencian a partir del periostio. El cartílago es reemplazado luego por el trabajo conjunto de osteoclastos y osteoblastos ⁽⁶⁾.

Por otro lado las BMU's (Unidades básicas multicelulares) son la unidad funcional y estructural del tejido óseo, contienen todos los elementos necesarios para su remodelado y actúan de forma integrada y secuencial con la participación de los osteoclastos y osteoblastos (REFA). Las BMU's son unas unidades altamente especializadas que se van a convertir en osteoclastos para remodelar el hueso y luego osteoblastos para producir nuevo hueso, este proceso es un estereotipo activación reabsorción- formación (ARF). Por otro lado, las micro fracturas van a generar el proceso de apoptosis en algunas células óseas, principalmente osteocitos, que liberan prostaglandinas y citoquinas para que finalmente se dé la remodelación ósea. Una vez este proceso termine, empieza a actuar la cascada de la coagulación y la cicatrización reduciendo así la actividad osteoclastica debido a dos sucesos: primero, que los osteoblastos que están conectados con los osteocitos por medio de uniones celulares crean una adhesión de moléculas impidiendo la llegada de los osteoclastos al sitio quirúrgico, y segundo, las citoquinas producen el RANKL ligando (ligando de receptor activador para el factor nuclear kB), y como el preosteoclasto en sangre tiene los

INTRODUCCIÓN

receptores RANK, al juntarse van a inducir al osteoblasto a producir OPG (Osteoprotegerin) inhibiendo la diferenciación y activación del osteoclasto. En otras palabras, el RANK y el OPG compiten para unirse con el RANKL (Figura 4). Una vez terminado este proceso llegan las BMU's y empiezan a formar el hueso según el estereotipo ARF, lo cual es fundamental para controlar la reabsorción ósea (REF CDEF).

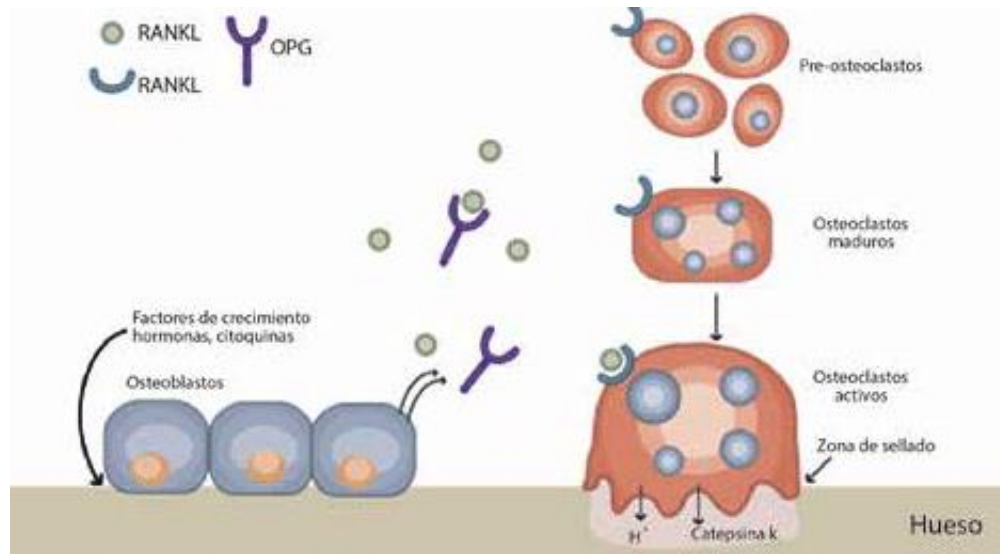


Figura 4. Proceso de remodelación del hueso. RANKL (verde): Ligando del Receptor Activador para el Factor Nuclear KB; RANKL (azul): Receptor Activador para el Factor Nuclear KB. OPG: osteoprotegerina. Figura tomada de: E. Michael Lewiecki, 2011 (11).

2.2 Andamios en ingeniería de tejidos

La Ingeniería de Tejidos es un área multidisciplinar que combina los principios de la Ingeniería, la física y las ciencias de la vida con el fin de desarrollar sustitutos biológicos de tejidos u órganos dañados que reparen, reemplacen o mejoren la función biológica perdida debido a anomalías congénitas, lesiones traumáticas, enfermedades o envejecimiento (7).

Algunas estrategias modernas de ingeniería de tejidos combinan células vivas y

andamios tridimensionales para el desarrollo de sustitutos biológicos que puedan restaurar las funciones tisulares. De manera adicional, se pueden utilizar para administrar moléculas bioactivas y acelerar el proceso de curación ⁽⁸⁾. La función principal de los andamios es proporcionar apoyo anatómico a las células multiplicadoras para reparar los tejidos dañados y en el proceso, sufrir gradualmente degeneración y reabsorción sin dañar los tejidos resultantes, por esta razón para su diseño se prefieren materiales porosos, biocompatibles y biodegradables que logren satisfacer las necesidades requeridas de regeneración y/o reparación de tejidos ⁽⁹⁻¹¹⁾, su arquitectura y composición deben favorecer las uniones celulares, la proliferación y diferenciación de las células hospedadoras circundantes al área lesionada ^(9,12,13).

Tipos de andamios

En 1970, Green *et al.*, generó lo que podría ser la primera evidencia de un andamio tisular, a partir de células de cartílago en espículas óseas. Desde entonces, ha surgido una gran cantidad de trabajos sobre el cultivo de células utilizando andamios diseñados a partir de materiales biocompatibles para la formación de nuevos tejidos ⁽¹⁴⁾. Es esperado que estos andamios posean propiedades osteoconductoras y osteoconductoras, que promueven la migración de elementos como células mesenquimales, osteoblasto, osteoclastos, vasculatura complementaria y promuevan la diferenciación de células osteogénicas ^(15,16).

Diversos materiales sintéticos y naturales, biodegradables y no biodegradables han sido utilizados en la fabricación de andamios óseos obtenidos a través de diferentes metodologías ⁽¹⁷⁾. Los materiales sintéticos tienen diversas ventajas sobre los materiales naturales en términos de mayor fuerza mecánica, biocompatibilidad, degradabilidad, efectividad y costos ⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Ejemplos de ellos son las cerámicas, los polímeros y los compositos ⁽²¹⁾.

2.3 Andamios Poliméricos

INTRODUCCIÓN

Los andamios de polímeros sintéticos consisten en materiales hechos a partir de poliésteres alifáticos tales como poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) y poli (caprolactona) (PCL), y sus copolímeros ^(22–26). Son biocompatibles, biodegradables, y se pueden sintetizar fácilmente en diferentes formas ⁽²⁷⁾. Otro ejemplos incluyen el poli (metacrilato de metilo), el poli (e-vcbxli sulfona) ⁽²⁸⁾.

Por otro lado, los andamios poliméricos naturales se componen de biomateriales extracelulares que se pueden clasificar 3 grupos: 1) proteínas (colágeno, gelatina, fibrinógeno, elastina, queratina, seda, etc.); 2) polisacáridos (glicosaminoglicanos, celulosa, amilosa, dextrano, quitina, etc.); y 3) polinucleótidos (ADN, ARN) ^(29–31).

Se ha reportado que los andamios basados en matriz extracelular (MCE) tienen muchas similitudes al tejido original ^(32,33). Este tipo de andamios pueden ser derivados de células (las células se usan para generar nuevo tejido óseo o sembrar en una matriz de soporte) o derivados de tejidos (el tejido óseo se usa directamente) ^(34–36). A diferencia de los andamios autógenos basados en ECM, los injertos alógenos y xenógenos deben ser desvitalizadas o descelularizadas para evitar la respuesta inmune del huésped. Aunque, los andamios autógenos tienen mínimos rechazos inmunológicos; alta histocompatibilidad; altas propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénica, su aplicación ha sido limitada debido a la necesidad de cirugía adicional, la morbilidad del donante y la falta de disponibilidad. Por otro lado aunque los andamios alogénicos y xenogénicos tienen efectos osteoconductores y osteoinductivos sin necesidad de cirugía adicional, están limitados debido al riesgo de transmisión de enfermedades e inmunogenicidad.

La disponibilidad es el principal problema con los andamios basados en ECM alógenos. Si bien los andamios xenógenos son abundantes, están limitados debido a la transferencia o mutación de ADN ^(37,38). La principal causa del rechazo del trasplante es la fuerte respuesta inmunitaria humana a los componentes celulares residuales de los injertos xenogénicos. El trasplante de xenoinjertos desencadena respuestas inflamatorias, inmunes y coaguladoras. Aunque, los polímeros naturales han mostrado

una gran biocompatibilidad y biodegradación controlada; las pobres propiedades mecánicas son la principal desventajas cuando se utilizan como andamios óseos ^(39,40). Las propiedades mecánicas, la biodegradabilidad y la consistencia de un lote a otro son difícilmente controlables en biomateriales de origen natural. Estos biopolímeros no brindan suficiente apoyo arquitectónico y protección para las células osteogénicas. Además, también pueden ocurrir reacciones inmunogénicas y la transmisión de patógenos debido al contenido impuro en biopolímeros naturales ⁽⁴¹⁾.

2.4 Cerámicas

El tejido óseo está constituido aproximadamente un 70% de hidroxapatita (HA) y 30% de colágeno ⁽⁴²⁾. Por lo tanto los andamios compuestos de cerámicas tienen la capacidad de mimetizar el tejido óseo y proporcionar mayor adherencia y proliferación de osteoblastos en comparación con otro tipo de materiales ⁽⁴³⁾. Entre las cerámicas reportadas la HA $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (CPC) ha sido ampliamente utilizada como un sustituto óseo desde hace aproximadamente 80 años ⁽⁴⁴⁾ ya que es biocompatible, osteoconductor ⁽⁴⁵⁾, similar a las porciones inorgánicas del tejido óseo y dental. Además, es mecánicamente resistente y bioactivo, no es antigénico, carcinogénico ni tóxico.

Sin embargo, la AH que se ha utilizado clínicamente no es biodegradable y permanece en el sitio de implantación durante largos periodos ⁽⁴⁶⁾, lo que limita la regeneración ósea. La falta de degradación se debe probablemente a las altas temperaturas durante la producción de cerámica ⁽⁴⁷⁾ y al tratamiento después de la síntesis que aumenta la cristalinidad y dificulta la biosorción. En este sentido, los materiales nano-estructurados con baja cristalinidad muestran alternativas potenciales a los injertos cuando se producen con materiales no sinterizados a baja temperaturas ⁽⁴⁸⁾ y pueden así, imitar a la apatita biológica ⁽⁴⁹⁾. Se han reportado modificaciones químicas exitosas de la AH mediante la sustitución de grupos fosfato (PO) y/o hidroxilo (OH) con carbonato (CO) ⁽⁵⁰⁾ con la finalidad de disminuir la cristalinidad y aumentar la solubilidad, que favorezca una rápida bioabsorción y regeneración ósea ⁽⁴⁸⁾.

Por otro lado, aunque la resistencia mecánica de la cerámica es superior en

comparación con los polímeros, es inferior a los huesos naturales, especialmente en términos de resistencia a la tracción y torsión. La HA tiene una gran compresión (500-1000 MPa) y fuerza de flexión (115-200 MPa) en comparación con el hueso humano (100-230 y 50-150 MPa respectivamente); sin embargo, su tenacidad a la fractura (1 MPa m^{0.5}) es mucho menor (2-12 MPa m^{0.5})⁽⁵¹⁾.

2. 5 Compositos

Los andamios contruidos de 2 o más materiales diferentes (Compositos), tienen la capacidad de combinar las ventajas de los materiales que son constituídos (materiales metálicos, cerámicos y polímeros)⁽²⁸⁾ y mejorar así las biopropiedades andamio y de degradación⁽⁵²⁾. Ejemplos de ellos, son los compuestos de polímero/cerámica que han demostrado excelentes propiedades mecánicas y osteoconductividad^(53,54). También se han estudiado compositos a partir de biocerámicas, como la CP, la HA y la TCP con poli (ácido L-láctico) (PLLA), colágeno, gelatina y quitosano,^(34,55-58) como materiales de apoyo en estudios de reparación ósea con similares resultados. Se ha demostrado que compositos de polietileno de alta densidad (HDPE) y Poli (ácido l-lactida-co-glicolida) (PLGA) con HA mimetizan algunas propiedades óseas, tales como mineralización y diferenciación celular⁽²⁸⁾. En un estudio compositos de colágeno/bioglass indujeron mineralización temprana y una sobre expresión de ALP⁽⁵⁹⁾.

Por otro lado, diversos trabajos han revelado que el recubrimiento de metales, vidrios, cerámicas inorgánicas y polímeros orgánicos (como PLGA, PS, PP y silicona), colágenos y fibras de seda utilizando fosfato de calcio, mejora la biocompatibilidad en aplicaciones ortopédicas^(17,60). En otro estudio se demostró que la utilización de espuma de hierro (Fe) recubierta con fosfato de calcio en células madre mesenquimales humanas optimiza la tasa de proliferación y diferenciación con respecto a las células que se expusieron a espuma no recubierta⁽⁶¹⁾.

Sin embargo, aunque el recubrimiento mejora la bioactividad, inhibe la degradación de la espuma de⁽⁶²⁾. Las aleaciones de Fe han mostrado una degradación *in vitro* más rápida en comparación con la forma pura⁽⁶³⁾. La fabricación de estructuras porosas a partir de metales biodegradables afecta las propiedades mecánicas y de

degradación del composito, la regeneración celular y el transporte del producto de degradación en la estructura ⁽⁶⁴⁾. En diversas investigaciones, utilizando animales de experimentación, Se ha observado que los andamios metálicos con rejilla de carbono y depósitos de tántalo (Ta) presentan una alta biocompatibilidad. Se propone que sus redes trabeculares permiten un crecimiento óseo apropiado y una alta estabilidad ⁽⁶⁵⁻⁶⁹⁾. También se ha demostrado que la incorporación de cobalto (Co) en andamios de bioglass mesoporosos induce hipoxia que aumenta la proliferación, diferenciación y expresión de genes relacionados con los huesos derivados de la médula ósea ⁽⁷⁰⁾.

2.6 Grafeno

El éxito de la ingeniería del tejido óseo depende entonces en gran medida de la funcionalidad del andamio. Identificación de nuevos materiales con propiedades como las arriba mencionadas es crucial para la eficiencia del proceso de regeneración de tejidos. Un material funcional que posee tales características es el grafeno ⁽⁷¹⁾. El grafeno es un material nanométrico bidimensional, consistente en una sola capa de átomos de carbono fuertemente cohesionados mediante enlaces que presentan hibridación sp^2 y dispuestos en una superficie uniforme, ligeramente ondulada, con una estructura semejante a la de un panal de abejas por su configuración atómica hexagonal.

Es una de las formas alotrópicas del carbono, como lo son también el grafito y el diamante ^(72,73). Su conductividad eléctrica y la movilidad de carga superan a los polímeros más conductores por varias órdenes de magnitud ⁽⁷⁴⁾ haciendo del grafeno un material revolucionario para dispositivos electrónicos como baterías, semiconductores, sensores electroquímicos, entre otras aplicaciones. Al ser fácilmente funcionalizado, el grafeno también se ha utilizado ampliamente en aplicaciones biomédicas (Figura 5) (biosensores, nanotransportadores para la administración de fármacos y genes, dispositivos para imágenes de células y fototerapia para el cáncer, etc.) ⁽⁷⁴⁻⁷⁸⁾.

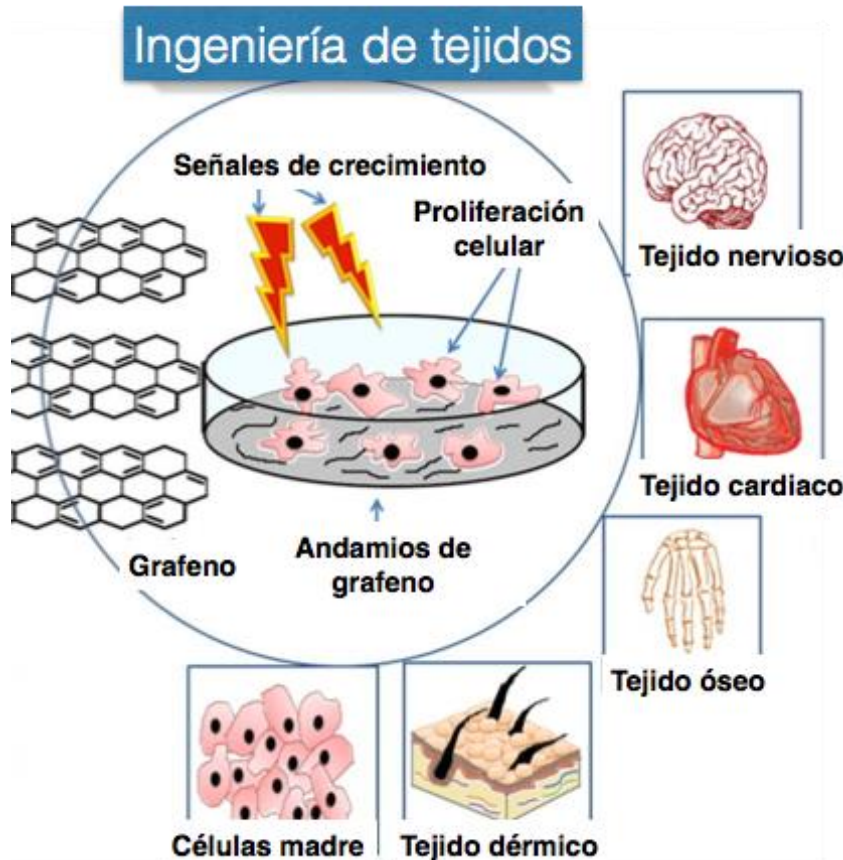


Figura 5. Aplicaciones de grafeno en ingeniería de tejidos. Imagen tomada de; Geetha Bai, R. *Et al.*, Graphene: A versatile platform for nanotheranostics and tissue engineering *Progress in Materials Science*, 2018.

Por otro lado, como el grafeno se puede sintetizar en una forma pura, ofrece una superficie sintonizable que ha permitido ser utilizado como un sustrato en experimentos con células cultivadas como células madre mesenquimales (MSC), células madre neuronales y células madre pluripotentes inducidas ^(20,35,74,79,80).

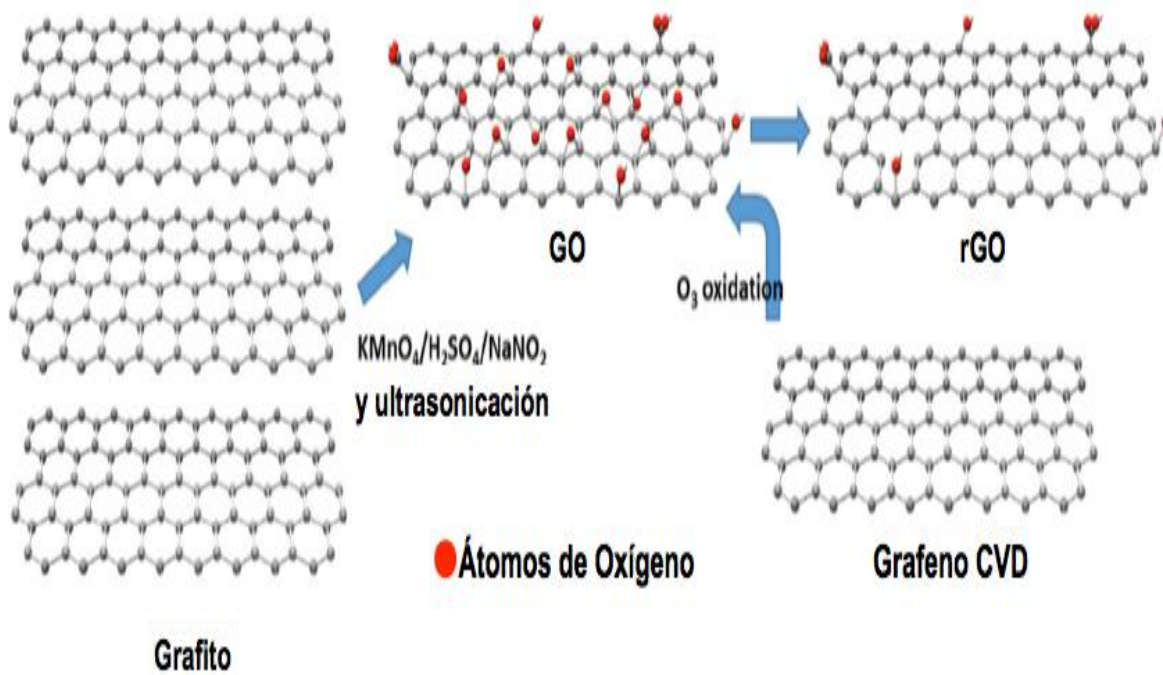


Figura 6. Esquema de la obtención y estructura de las diferentes formas del grafeno a partir de grafito. GO: óxido de grafeno; rGO: óxido de grafeno reducido; CVD: *Chemical Vapor deposition* (por sus siglas en inglés) grafeno.

Los derivados de Grafeno pueden clasificarse en base a su número de capas (por ejemplo, grafeno mono o multicapa) o por su modificación química, como el óxido de grafeno (GO) o GO reducido (rGO) (Figura 6). El GO es una forma de grafeno altamente oxidado obtenida a partir de la oxidación del grafito. Este compuesto anfifílico permite la funcionalización de su superficie (mediante la reacción de sus grupos funcionales, OH, COOH y COC con diferentes sustratos) y es dispersable en soluciones acuosas, por lo que su uso es factible en la liberación fármacos y genes, modificación de sustratos etc. ^(35, 74, 77,79).

Por otro lado, el rGO es la forma reducida del GO que se obtiene mediante la eliminación de los grupos que contienen oxígeno con la recuperación de una estructura conjugada parecida al grafito ^(34,74). El grafeno en diferentes formas se puede obtener utilizando diferentes enfoques, los cuales incluyen exfoliación mecánica y/o química de

grafito. El método mecánico, también conocido como "Scotch tape" o técnica de despegue, permite el desprendimiento de hojuelas de grafeno en la orden de micrómetros a partir de un cristal de grafito utilizando cinta adhesiva ^(34,71).

En la exfoliación química, el grafito se oxida utilizando ácidos fuertes como el ácido sulfúrico o nítrico. El procedimiento inserta átomos de oxígeno entre las hojas individuales del grafeno y los obligándolas a separarse, lo que resulta en una suspensión de hojas GO que son posteriormente filtradas para su aislamiento en forma de escamas GO. Dado que el GO presenta funcionalidades de oxígeno, puede ser dispersado en agua, medios fisiológicos, y diversos solventes orgánicos ⁽⁸¹⁾.

Otros métodos para la obtención de grafeno incluyen el crecimiento epitaxial y la deposición química de vapor (CVD) ^(19,71). Este último es un versátil y escalable método para la producción de gran escala y alta calidad del grafeno que puede transferirse a diversos sustratos ⁽⁶⁰⁾.

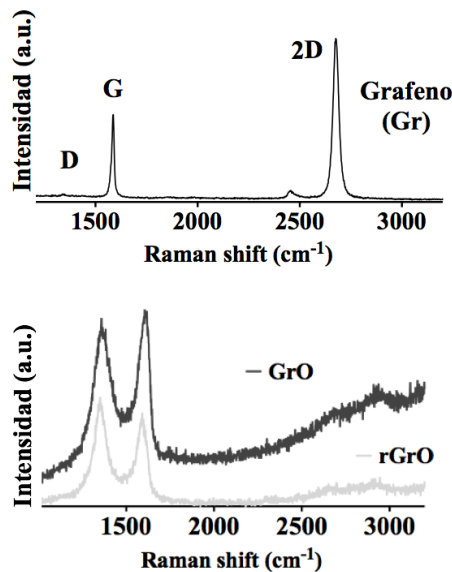


Figura 7. Espectro Raman de pristine grafeno (espectro superior) y sus derivados: óxido de grafeno (GrO) y óxido de grafeno reducido (rGrO) (espectro inferior).

En un proceso típico de CVD, un sustrato de cobre o níquel se coloca en una

cámara de reacción (generalmente un tubo de cuarzo) donde se bombean los gases precursores (CH_4 y H_2) a altas temperaturas ($\sim 1000^\circ\text{C}$). La alta temperatura lleva a la pirólisis de los precursores y disocia los átomos de carbono que luego reaccionan con el sustrato para producir la película delgada de grafeno. El grafeno cultivado con CVD es flexible e hidrófobo, por lo que es muy utilizado como el células cultivadas para promover la proliferación celular y mejorar sus funciones ^(4,74,82-85). Los diversos métodos para producir grafeno dan como resultado materiales con diferente número de capas y/o grupos químicos.

Estas diferencias estructurales se reflejan en cambios de las bandas de electrones, en los espectros de Raman, que permiten la identificación y caracterización precisa de los derivados, mediante el análisis de tres picos: G, 2D y D (Figura 7). Las bandas G y 2D son las más destacadas en las muestras de grafeno: la banda G ($\sim 1587 \text{ cm}^{-1}$) surge del estiramiento del enlace C-C en materiales gráfiticos mientras que la banda D ($\sim 1340 \text{ cm}^{-1}$) solo se activa si hay trastorno o defectos presentes. La banda 2D ($2500\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$) está presente en todos los tipos de materiales de carbono sp^2 y se utiliza para determinar el número de capas de grafeno ⁽⁸⁶⁾.

2.6.1 Características generales y propiedades del grafeno

El grafeno tiene unas propiedades muy interesantes que lo convierten en un material muy versátil con infinidad de aplicaciones en numerosos ámbitos. Como se ha explicado anteriormente, puede ser sintetizado con ayuda de diversos elementos de manera que dependiendo del elemento utilizado, el producto final puede tener diferentes propiedades.

2.6.2 Propiedades eléctricas

Su estructura de red hexagonal en dos dimensiones permite una superposición de las bandas de valencia (orbitales pz) y de conductancia, proporcionándole una dispersión lineal. Es decir, permite que sus electrones se comporten como partículas sin masa que pueden moverse libremente por toda la lámina. Esta cualidad, además es independiente a la temperatura, lo que presenta una gran ventaja frente a otros

dispositivos electrónicos. Otros materiales, al poseer impurezas en su estructura, dificultan y ralentizan el movimiento de los electrones, sin embargo, el grafeno al provenir únicamente de un compuesto puro carece de dichas impurezas ⁽⁸⁷⁾.

2.6.3 Permeabilidad

Permite el paso de agua, sin embargo, impide el paso de elementos pequeños como el helio ⁽⁸⁷⁾.

2.6.4 Propiedades mecánicas y elasticidad

Un microscopio de fuerza atómica es un instrumento capaz de detectar fuerzas de cohesión, este se aplicó de forma perpendicular a una lámina de grafeno, con el objetivo de medir su límite elástico. Como el grafeno apenas presenta defectos en su red puede estirarse de forma reversible hasta un 10% de su tamaño habitual, mientras que el resto de los sólidos soportan sólo alrededor del 3% ⁽⁸⁸⁾.

El valor módulo de Young del grafeno es 0.5 TPa , esto supone el doble que el del acero (0.21TPa) o el silicio (0.19 TPa), aunque menor que el del diamante (1.05 TPa). Esto quiere decir que tiene una gran resistencia a la rotura sin deformarse, propiedad muy útil en nanotecnología.

Estas propiedades difieren tanto del grafito, del cual procede, debido a que el grafito está constituido por láminas de grafeno unidas por fuerzas de Van der Waals las cuales, al aplicar una fuerza mecánica, se rompen con mayor facilidad que las uniones covalentes que hay entre los átomos de carbono de una lámina de grafeno.

2.6.5 Otras propiedades

Ligereza, capacidad de soportar radiación ionizante, evita la corrosión de otros materiales y capacidad de reacción con otras sustancias ⁽⁸⁸⁾.

2.6.6 Toxicidad

Para poder utilizar el grafeno en aplicaciones biomédicas es imprescindible conocer su toxicidad. Estudios recientes han demostrado cierta citotoxicidad celular del grafeno, que puede provocar una disminución de la adhesión celular, inducción de la

apoptosis celular e introducción en ciertos compartimentos celulares. Sin embargo, al realizar estos estudios sobre GO se afirma una ausencia de citotoxicidad celular. También ha sido evaluada la influencia en la citotoxicidad de diversos factores tales como la concentración o la forma, siendo estos relevantes.

Aunque el factor más relevante de todos es la funcionalización de la superficie ⁽⁸⁹⁾, es decir, la introducción de grupos funcionales en la superficie del grafeno. Esta técnica puede ayudar a disminuir la fuerte interacción que hay entre el grafeno/GO y las células y tejidos. Además, puede ayudar a reducir la generación de especies reactivas de oxígeno, que desencadenan apoptosis celular por la activación de la caspasa-3.

Al utilizar GO funcionalizado en estudios en vivo, se pudo comprobar como este se acumula en el sistema retículo endotelial en hígado y bazo, de tal manera que era fácilmente eliminado del cuerpo del ratón sin provocarle citotoxicidad, mientras que al administrar GO, este se acumulaba en pulmón pudiendo producir edema y formación de granulomas en el mismo. Por lo tanto, es necesario funcionalizar las láminas de GO y grafeno para poder utilizar en aplicaciones biomédicas ⁽⁹⁰⁾.

2.6.7 Diferenciación de células madre

Debido a la gran importancia de la diferenciación de células madre en las distintas líneas celulares se ha investigado la opción de utilizar el grafeno en este fin. Así un estudio reciente demuestra una mayor diferenciación neuronal de células madre mesenquimales humanas utilizando al grafeno como superficie. Esto es así porque sirve como una capa de adhesión celular con efecto de acoplamiento eléctrico para la estimulación eléctrica para la diferenciación. Además, al utilizar el grafeno como superficie también ha favorecido una mayor diferenciación de células osteogénicas. Sin embargo, la diferenciación adipogénica fue suprimida con el uso de grafeno, pero aumentada por el uso de GO, esta diferencia se explica por las diferentes propiedades que adquiere cada uno al ser funcionalizado con diferentes estructuras ⁽⁹¹⁾.

3. JUSTIFICACIÓN

Los defectos óseos son un gran problema hoy en día en las diferentes áreas de la odontología, debido, en gran parte, a que diversos tratamientos implican el retiro de un fragmento de hueso sin colocar ningún tipo de material o soporte que ayude a la regeneración del tejido, provocando así, un defecto óseo que puede resultar en un problema tanto estético como de restauración.

Actualmente existen diferentes materiales en el mercado que pueden ayudar a evitar este tipo de defectos, sin embargo son de un alto costo, lo que trae como consecuencia elevar el valor monetario de la intervención clínica, por lo cual en múltiples ocasiones estos no se utilizan. Es por ello que existe la necesidad de realizar investigaciones enfocadas en la generación de nuevos materiales que cumplan con las características para su utilización clínica y con menor valor económico.

En este sentido el grafeno se ha convertido en un material prometedor debido a su bajo costo y a sus propiedades mecánicas, físicas y químicas y biológicas únicas, lo que apoya su introducción como un material alternativo para la ingeniería de tejidos en restauración ósea.

Por otro lado, las potenciales ventajas de usar andamios de óxido de grafeno mono-capa y óxido de grafeno con Calcio como materiales que promueven el crecimiento celular, y en consecuencia la regeneración del tejido óseo, sin el uso de adicional de una membrana que cubra y sirva de “puente” del defecto inducido, no se han explorado *in vitro*.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por todo lo anterior, y con finalidad de proponer materiales alternos y de bajo costo para la práctica clínica, el presente proyecto pretende evaluar el potencial uso del 2 derivados de grafeno, óxido de grafeno (GrO) y óxido de grafeno calcio (GrOCa), como andamios celulares para la restauración ósea en un modelo animal.

5. HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis de trabajo

Los derivados de grafeno injertados sobre defectos óseos inducidos mejoran el crecimiento y reconstrucción del hueso en los grupos de ratones utilizados con respecto al grupo control.

5.2 Hipótesis nula

No se observa diferencias significativas en crecimiento y reconstrucción ósea de los ratones injertados con derivados de grafeno con respecto al grupo control.

5.3 Hipótesis alternativa

Se observa crecimiento y/o reconstrucción ósea en alguno(s) de los grupos los ratones injertados con derivados de grafeno con respecto al grupo control.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Análisis histológico de derivados de grafeno como andamios moleculares para la restauración ósea.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Ejecución del defecto óseo y aplicación del injerto en las ratas de experimentación.

6.2.2 Monitoreo y sacrificio de los animales injertados.

6.2.3 Obtención de biopsias.

6.2.4 Análisis histológico de las muestras obtenidas.

6.2.5 Análisis de resultados.

7. VARIABLES

7.1 Variables independientes

1. Oxido Grafeno y grafeno con calcio
2. Cantidad de ratas
3. Tiempo de contacto con la rata

7.2 Variables dependientes

1. Cantidad de regeneración ósea
2. Cantidad de reabsorción de los materiales

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Reactivos químicos

PROCIN® Xilazina, DAMAX INYECTABLE Clindamicina, PROFENID® IM Ketoprofeno, PISABENTAL® Pentobarbital sódico, Solución CS-Pisa®, óxido de grafeno y óxido de grafeno con Ca, Alcohol, ISODINE® SOLUCION

8.2 Equipo

Bascula digital con recipiente metaltex Max 5 kg x 1 g Max 11 Lb x ½ oz, Rasuradora Afeitadora Wahl, Pieza De Alta Velocidad Marca Nsk Panamax Led y Unidad dental portátil, gasas estériles, guantes estériles, cubre bocas, batas desechables, sutura vicryl 4-0, hoja de bisturí #15, mango de bisturí, estuche de sutura y disección, plumones sharpie, fresas de carburo bola #4 tallo largo y jeringas de 10, 3 y 1 ml.

8.3 Animales

Se utilizaron 10 ratas adultas (*Rattus norvegicus albinus*; Wistar), que pesaban entre 200 y 350 g. Los animales se alojaron en habitaciones con temperatura controlada y recibieron agua y alimento a voluntad. Los animales se asignaron al azar a uno de los 2 grupos experimentales perteneciendo 5 a cada grupo: grupo I (9 días), grupo II (21 días).

8.4 Metodología

8.4.1 Procedimiento quirúrgico

Los animales fueron anestesiados con hidrocloreto de xilazina y clorhidrato de ketamina. Después del afeitado se procedió a la asepsia y antisepsia sobre el cráneo; posteriormente se realizó una incisión sobre la línea media de aproximadamente 2cm, se disectaron los planos cutáneo y subcutáneo hasta visualizar el periostio. Se hizo un defecto circular de 4 mm de grosor completo en el hueso parietal utilizando una pieza

de alta velocidad (Pieza De Alta Velocidad Marca Nsk Panamax Led) colocada en una unidad dental portátil y con una fresa quirúrgica de tallo largo bola #4.

Metodología

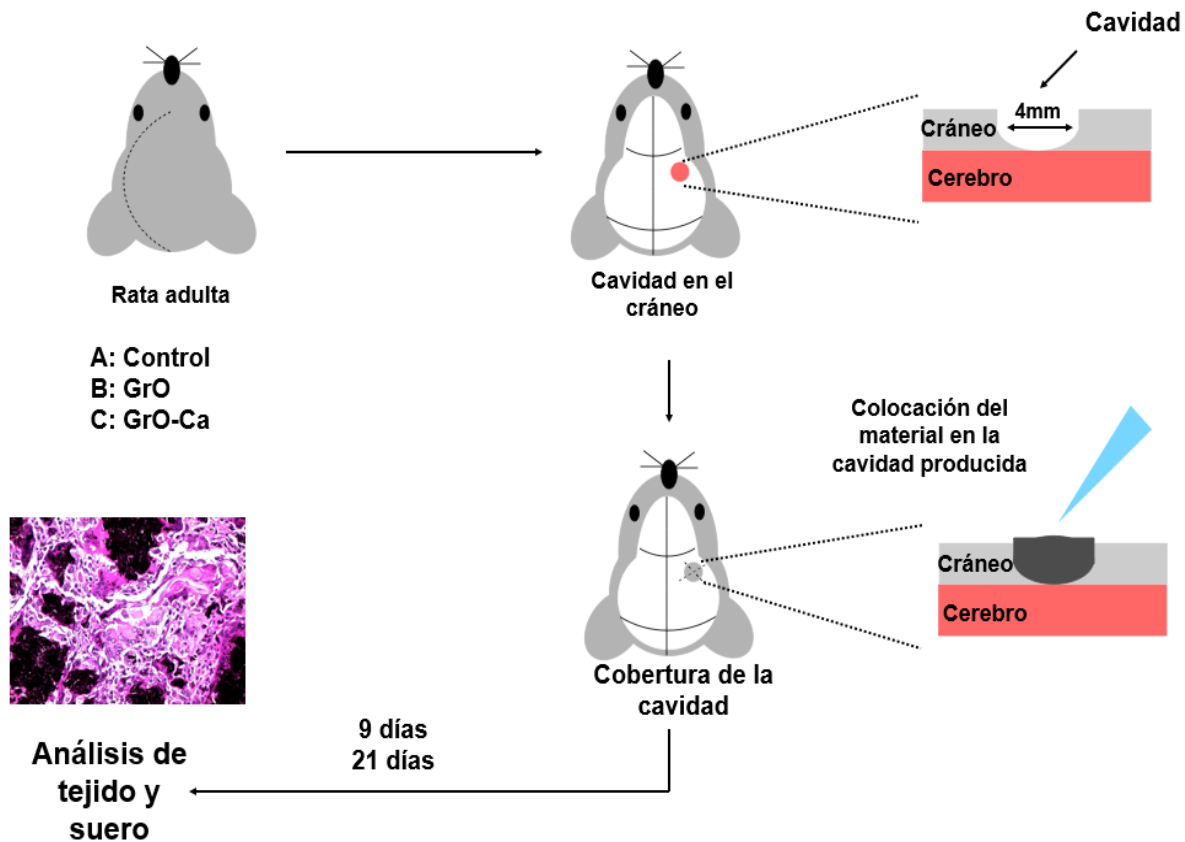


Figura 8. Representación esquemática de la metodología para aplicación del injerto en el modelo animal.

El procedimiento se realizó en ambos parietales. Se realizaron 2 defectos en cada animal, en 1 defecto se colocaba material designado y en el defecto contrario solo se realizaba la trepanación para utilizarlo como control. Los defectos óseos se trataron de acuerdo con las condiciones prescritas para cada uno de los grupos.

8.4.2 Sacrificio de los animales en experimentación y obtención de biopsias

Posteriormente de acuerdo a los días de muestra de cada grupo se sacrificaron las ratas utilizando una sobredosis de anestesia (PISABENTAL® Pentobarbital sódico)

MATERIALES Y MÉTODOS

y se tomó la muestra seccionando ambos huesos parietales. Las muestras de tejido, después de la toma, se introdujeron en solución de formol al 10% (formalina) con una relación mínima de volumen por peso de 10:1.

Se recolectaron en frascos de plástico, para evitar derrames y permitir una buena manipulación, previamente etiquetados e identificados con el código correspondiente al animal y material aplicado. Los controles también fueron procesados e incluidos conforme al protocolo. Se procuró agitar suavemente cada frasco antes de colocarlos en la caja de transporte.

Tiempo de impregnación: conforme al tamaño de la muestra y de la temperatura ambiente, los tejidos se fijaron entre 18 y 20 horas posteriores a la toma. Por ser tejido duro el material a procesar se descalcificó empleando ácido fórmico al 8% en una solución acuosa con formalina por 48 horas.

8.4.3. Análisis histológico de las muestras obtenidas

Las muestras pasaron por un procesamiento de tejido para poder realizar los cortes histológicos, así como también se realizó un cuestionario para poder facilitar la toma de datos al observar estos mismos cortes en donde se cuestionaría:

- Patrón de Inflamación
- Grado de inflamación
- Presencia de Neutrófilos
- Presencia de Linfocitos
- Presencia de Macrófagos
- Presencia de Células gigantes multinucleadas (CGM)
- Presencia de angiogénesis
- Presencia de Reacción fibroblástica
- Presencia de hemorragia
- Presencia de Hemosiderina

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de tejidos. Las muestras se recibieron para ser procesadas en la Escuela de Ciencias de la Salud, Valle de las Palmas; donde se separaron e identificaron para iniciar el proceso de tratamiento para los tejidos de las muestras.

Cada muestra fue seccionada longitudinalmente, partiendo de la referencia anatómica del defecto óseo y del material empleado sobre el defecto quirúrgico. Se realizaron cortes paralelos al corte primario, en todas las muestras; con esto se evidenciaron superficies seriadas del tejido a observar. Se incluyeron de tres a cuatro cortes de cada muestra para el procesamiento, inclusión e imbibición en parafina. Las cápsulas con el tejido fueron tratada en el procesador de tejidos modelo SP-120 siguiendo el protocolo de la tabla 1.

Tabla 1. Protocolo del procesamiento en parafina de las muestras de tejido óseo en el proceso de tejido modelo SP-120.

Vaso N°	Reactivo	Tiempo de inmersión Horas:Minutos	Velocidad de agitación	
			rpm.	Valor en el programa
1	Formol	01:00	60	1
2	Formol	01:00	60	1
3	Alcohol 70%	01:30	70	2
4	Alcohol 80%	01:30	70	2
5	Alcohol 96%	01:30	70	2
6	Alcohol 100%	01:00	70	2
7	Alcohol 100%	01:00	70	2
8	Alcohol 100%	01:00	70	2
9	Xylol	01:30	70	2
10	Xylol	01:30	60	1
11	Parafina	02:00	60	1
12	Parafina	02:00	60	1

Después de 16 horas, ya hecha la imbibición de los tejidos en parafina, se procedió a realizar la inclusión de los tejidos en bloques de parafina de grado

MATERIALES Y MÉTODOS

histológico. Para este paso se realizó la orientación de las muestras conforme al protocolo para su observación al microscopio óptico. Se realizaron cortes en el micrómetro de 5 micrómetros aproximadamente, que se colocaron en la tina de flotación, para ser situados en los portaobjetos.

Una vez que los tejidos estuvieron sobre los portaobjetos, se procedió a realizar la técnica de tinción con hematoxilina y eosina según la Figura 9. Finalmente Los tejidos teñidos fueron sellados con resina histológica y cubiertos con cubreobjetos #1.

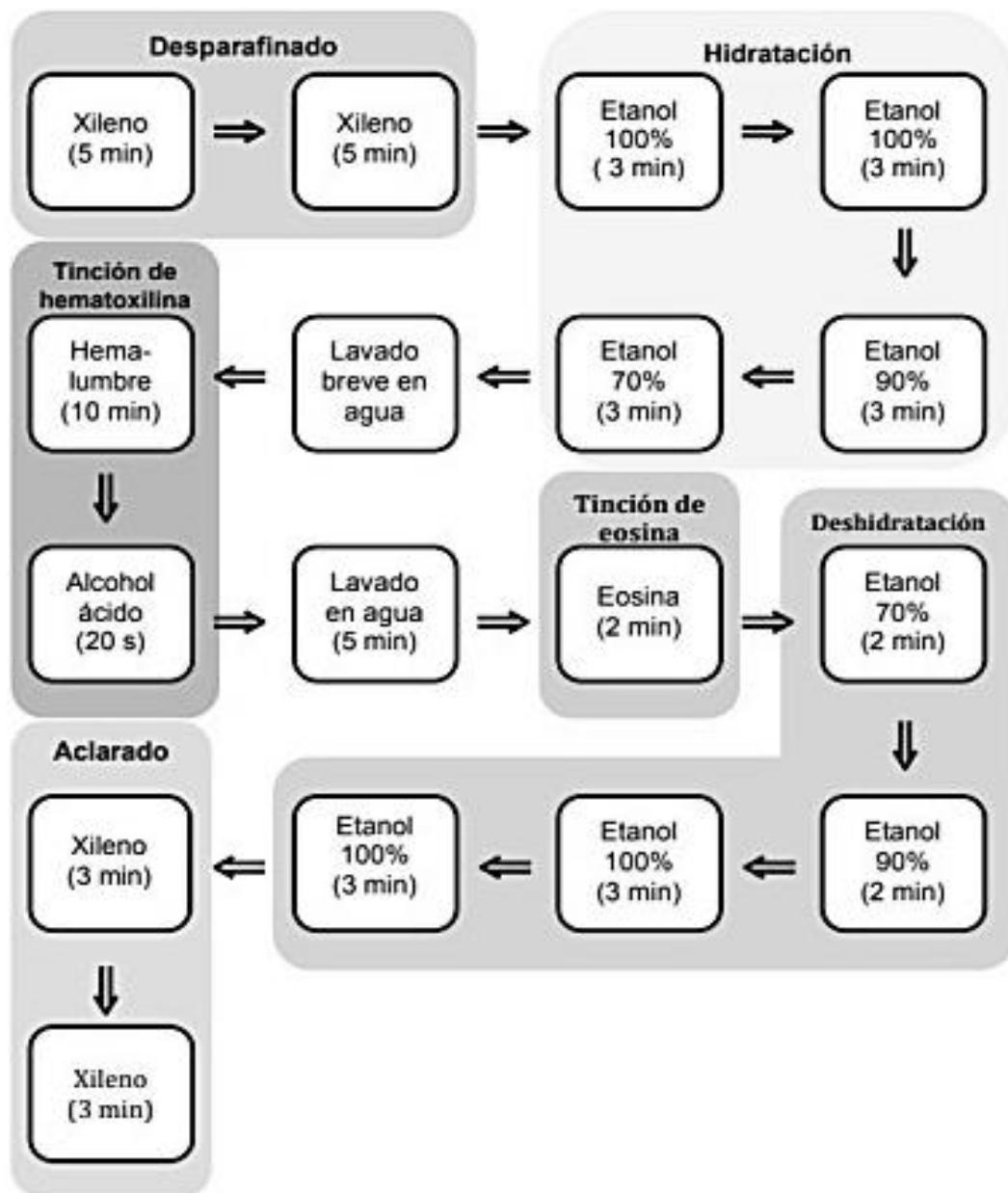


Figura 9. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina a las que fueron sometidas las muestras de tejido óseo.

9. RESULTADOS

9.1 Ejecución del defecto óseo y aplicación del injerto en las ratas de experimentación

Se llevó a cabo el procedimiento quirúrgico para la ejecución del defecto óseo y aplicación del injerto según el protocolo descrito en la metodología (8.4.1). En la Figura 10 se puede observar las características de las incisiones realizadas y la localización y características de los defectos óseos inducidos en el cráneo de los animales.

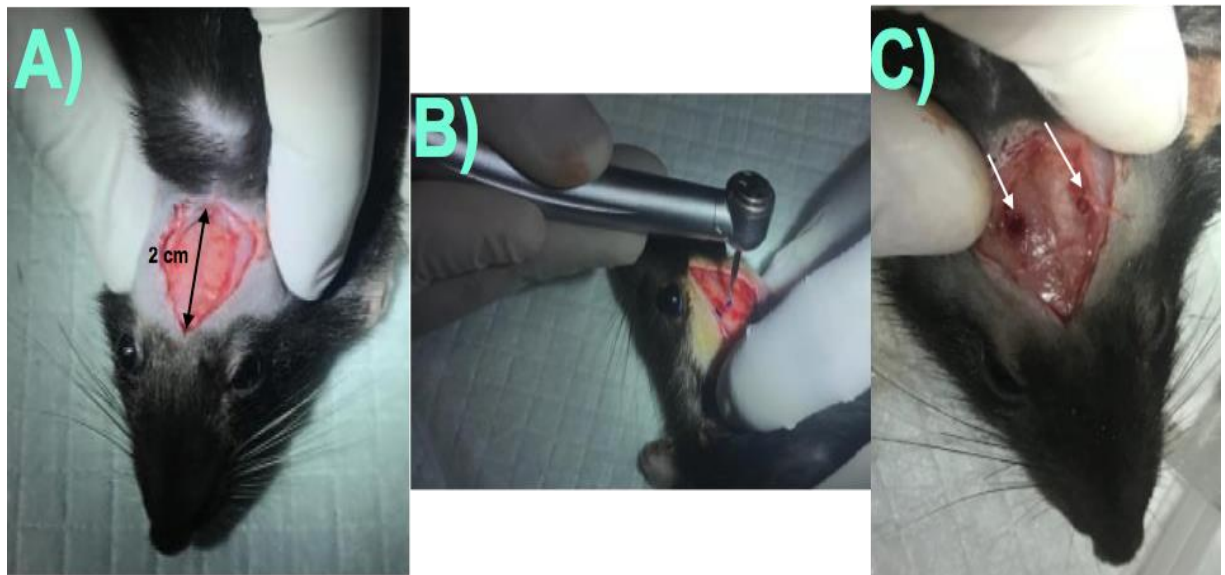


Figura 10. Procedimiento quirúrgico. A) Preparación para el defecto quirúrgico (Incisión 2 cm). B) Ejecución de los defectos (4mm) en el hueso parietal. C) Localización de los defectos por duplicado.

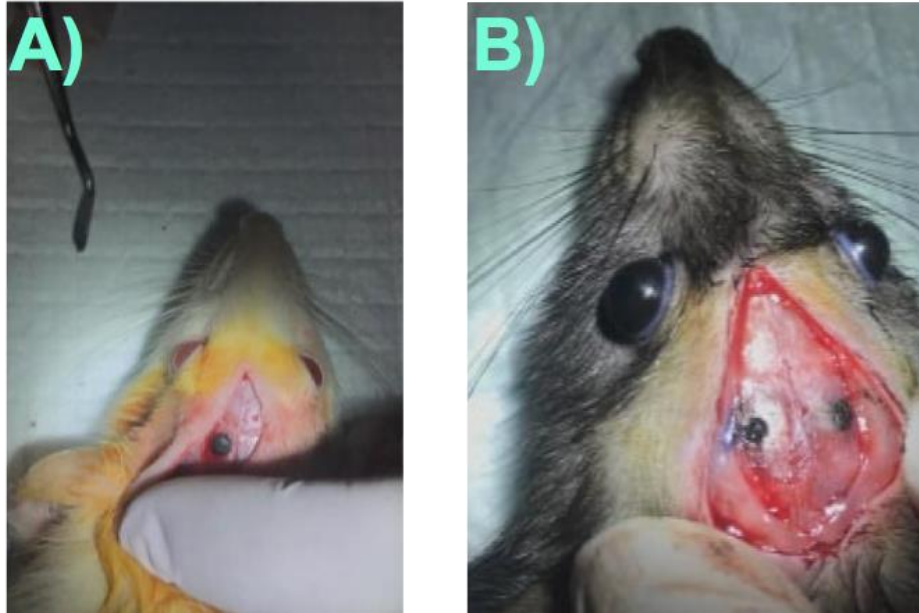


Figura 11. Localización de los defectos y colocación de injertos. A) Localización de los injertos por duplicado. B) Acercamiento del sitio de colocación de los injertos.

Una vez que se realizó la incisión se colocaron los injertos de GrO y GrOCa, como se observa en la Figura 11.

9.2 Monitoreo de los animales post cirugía

Los animales se recuperaron en una cama plana de papel para tratar de ayudar a mantener el calor y mejorara la recuperación, se mantuvieron observados hasta que el animal recupero la capacidad de derecho en sí mismo y se comenzó a mover con normalidad.

Al día siguiente de la cirugía los animales se observaban alertas y activos, comiendo y bebiendo normalmente, y así continuaron hasta el momento de su sacrificio. En ningún momento se observó depresión en los animales, no se observó ningún signo de infección en la herida, se comenzó a observar cicatrización del tejido a los 5 días después de la cirugía. Al momento de realizar la obtención de muestra del primero grupo (9 días) la herida ya estaba cicatrizada por completo.

9.3 Obtención de biopsias

RESULTADOS

Se recolectaron las muestras óseas para su posterior procesamiento según el protocolo descrito en la metodología sección 7.4.2. (Figura 12).

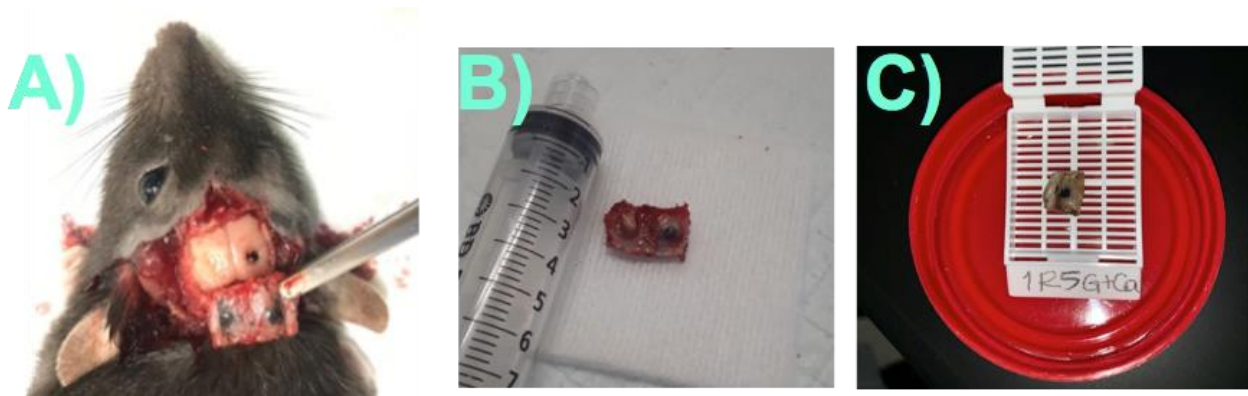


Figura 12. Procedimiento para la obtención de muestras óseas. A y B) Colección de la biopsia y característica de la muestra (1cm x 1.5 cm). C) Etiquetado y almacenamiento de la muestras.

9.4 Análisis histológico de las muestras obtenidas

En el presente estudio se realizaron cortes histológicos para poder observar si se encontraba formación de tejido óseo o algún indicio de esto. De acuerdo a los cortes obtenidos y a los datos arrojados por el cuestionario se llegó a los siguientes resultados:

9.4.1 Grupo I (9 días)

Rata 4, Control (R4C-9). En la rata 4 en la muestra de control se encontró inflamación de tipo aguda con un grado leve así como también la presencia moderada de neutrófilos así como una leve angiogénesis y reacción fibroblástica. También se observó fibrina y hemorragia de una manera leve. No se encontraron osteoblastos ni tejido osteoide en las zonas examinadas. La reparación de los defectos quirúrgicos fue mínima.

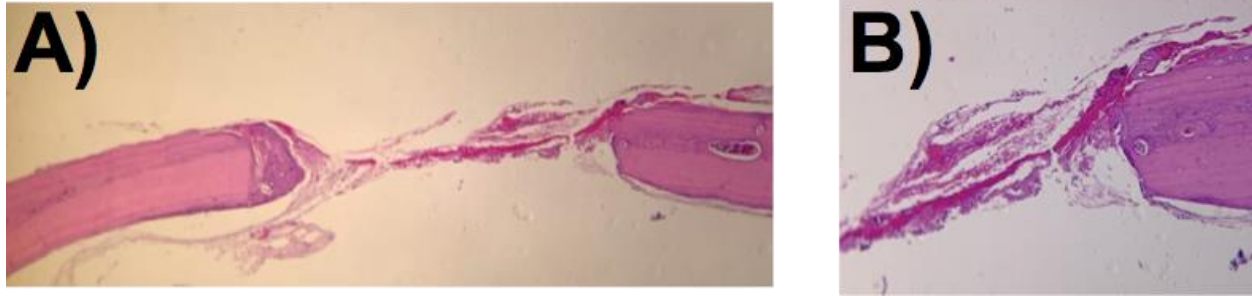


Figura 13. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R4C-9**. A) Se observa fibrina y hemorragia formada en el espacio creado quirúrgicamente, 40x B) Se observa fibrina y hemorragia junto al hueso, 100x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 4, Óxido de grafeno (R4GrO-9). En la rata 4 en la muestra que se utilizó GrO, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado moderado, se observó presencia moderada de neutrófilos y una presencia leve de linfocitos y macrófagos así como una presencia moderada de angiogénesis y reacción fibroblástica debajo y entre el material óxido de grafeno, se observa también presencia de hemorragia de una manera leve. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de células gigantes multinucleadas (CGM) en reacción al óxido de grafeno.

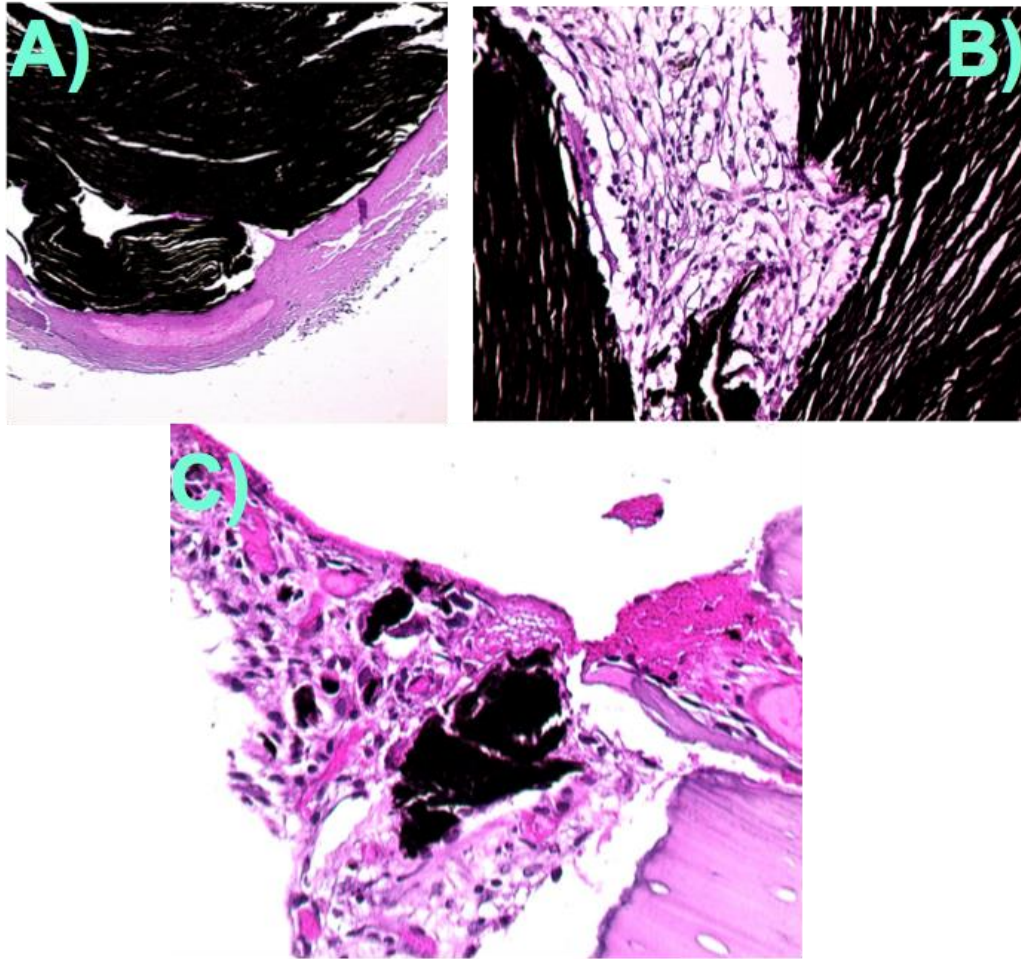


Figura 14. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R4GrO-9**. A) Se observa la formación de tejido fibrosos debajo del injerto, 100x B) Se observa tejido conectivo formado entre el injerto, 400x C) Se observa una parte del injerto y la formación de tejido alrededor, 400x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina

Rata 5, Óxido de grafeno (R5GrO-9). En la rata 5 en la muestra que se utilizó GrO, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado moderado, se observa presencia leve de neutrófilos y linfocitos. También se observó presencia moderada de macrófagos, angiogénesis y reacción fibroblástica. Se observa presencia de hemorragia de una manera leve. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM en reacción al óxido de grafeno pero de una manera escasa. Se pudo apreciar una reacción en relación al óxido de grafeno en donde se observa tejido osteoide formando una especie de cuña desde ambos lados del material y debajo del hueso de la muestra.

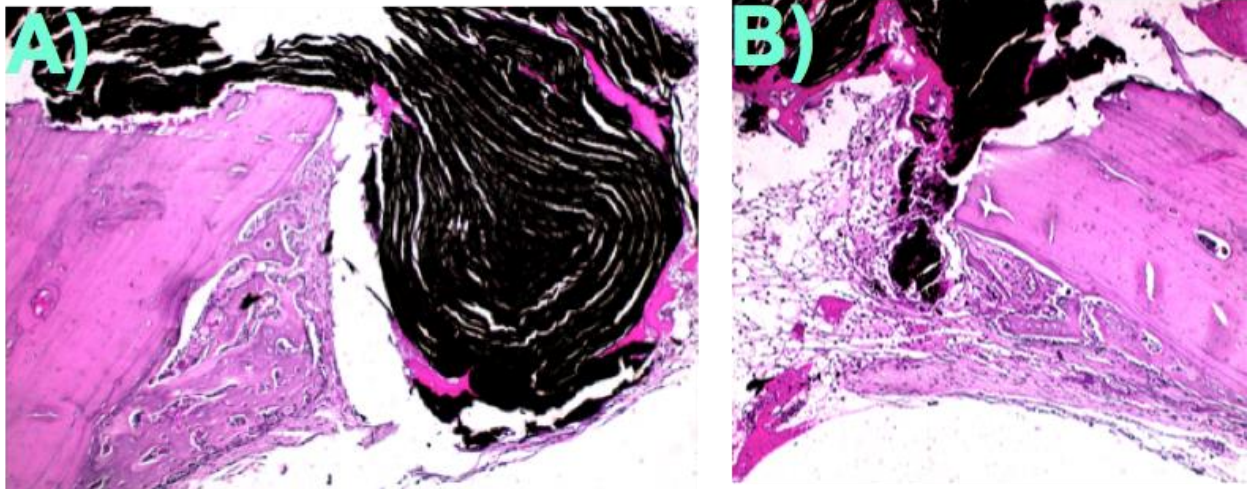


Figura 15. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R5GrO-9**. A) Se puede observar la formación de tejido osteoide organizado en una especie de "cuña" entre el injerto y el hueso, 100x B) Se observa tejido osteoide en relación con el injerto, 100x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 5, Óxido de grafeno + Calcio (R5GrOCa-9a). En la rata 5 en la muestra que se utilizó GrOCa, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado moderado, se observa presencia leve de linfocitos, neutrófilos de manera moderada al igual que macrófagos. También se observó presencia moderada de angiogénesis y reacción fibroblástica. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM en reacción al material. Se pudo apreciar una reacción en relación al GrOCa en donde se puede observar tejido osteoide. También se observa cómo se relaciona el GrOCa con el tejido conectivo.

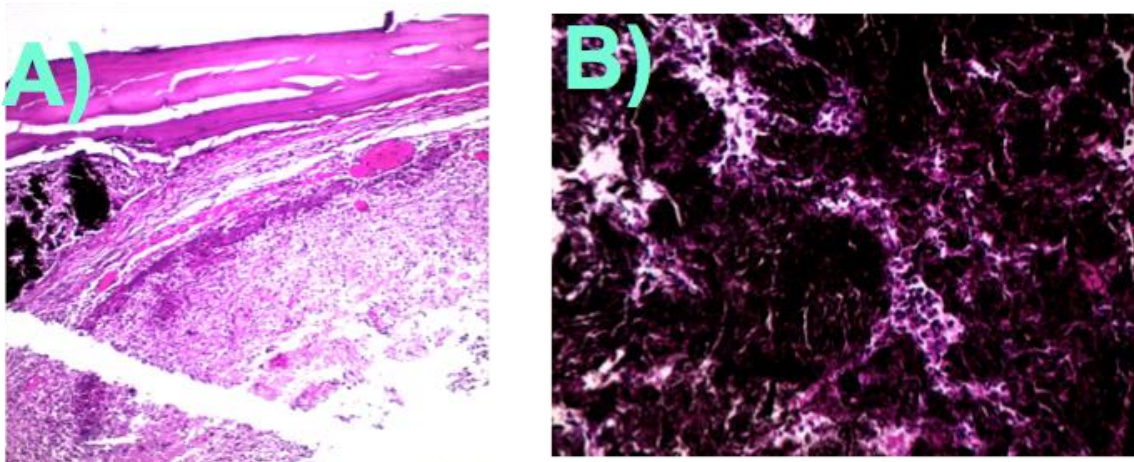


Figura 16. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R5GrOCa-9a**. A) Se observa la reacción celular causada por el injerto en donde se promueve la formación

de tejido osteoide, 100x B) Se observa la formación celular entre el injerto, 400x
Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

9.4.2 Grupo II (21 días)

Rata 1, Control (R1C-21). En la rata 1 en la muestra de control, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado moderado, se observa presencia leve de neutrófilos y linfocitos. También se observó presencia moderada de macrófagos, angiogénesis, reacción fibroblástica y hemorragia. Se observa también hemosiderina de manera moderada.

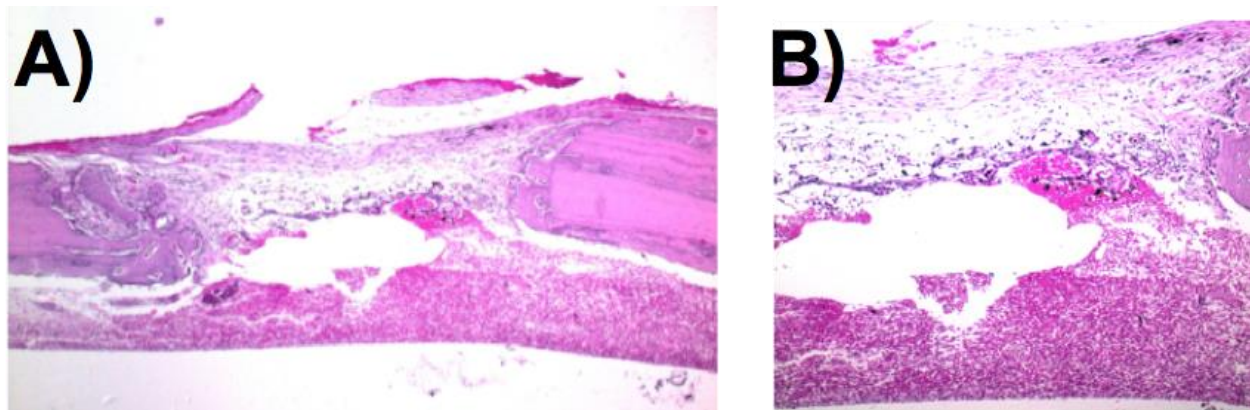


Figura 17. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R1C-21**. A) Se observa hemorragia y tejido conectivo, 40x B) Se observa tejido conectivo que se forma en el defecto quirúrgico, 100x Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 1, óxido de grafeno (R1GrO-21). En la rata 1 en la muestra que se utilizó GrO, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado leve, se observa presencia leve de neutrófilos y linfocitos. También se observó presencia moderada de macrófagos, angiogénesis y reacción fibroblástica. Se observa también hemorragia y hemosiderina de manera leve. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM en reacción al material. Se pudo observar el tejido conectivo mayor distribuido entre el GrO y la formación de tejido óseo debajo del material.

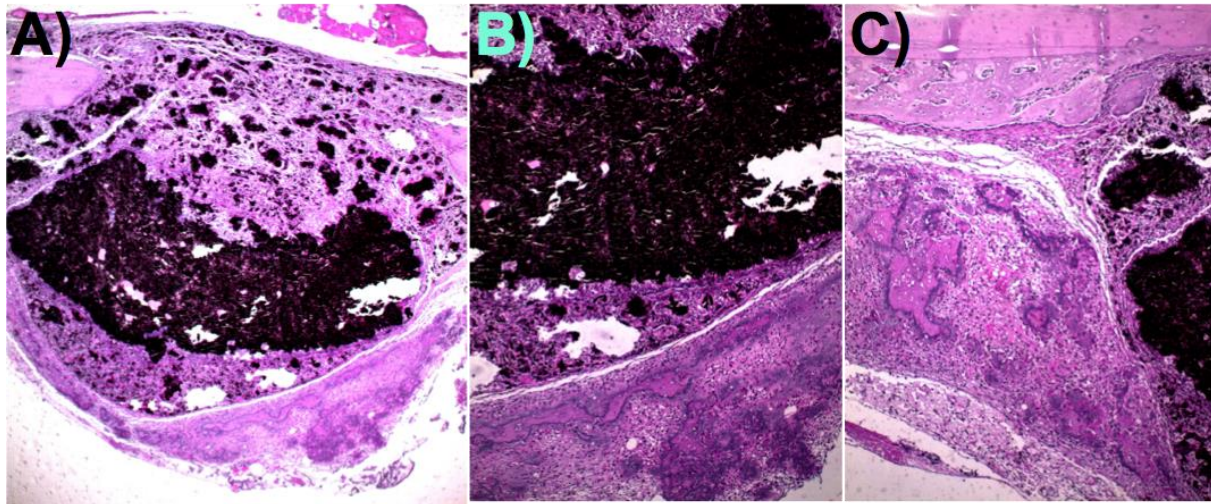


Figura 18. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R1GrO-21**. A) Se observa tejido conectivo entre el material al igual que formación de tejido óseo alrededor del injerto, 40x B) Se observa Tejido óseo debajo del injerto, 100x C) Se puede observar tejido óseo formando una especie de "cuña" entre el injerto y el hueso, 100x Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 2, Control (R2C-21). En la rata 2 en la muestra de control, se observó un patrón de inflamación crónica con un grado leve, se observa presencia leve de macrófagos, angiogénesis y reacción fibroblástica. Se observa también hemosiderina de manera leve. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM hacia un cuerpo extraño.

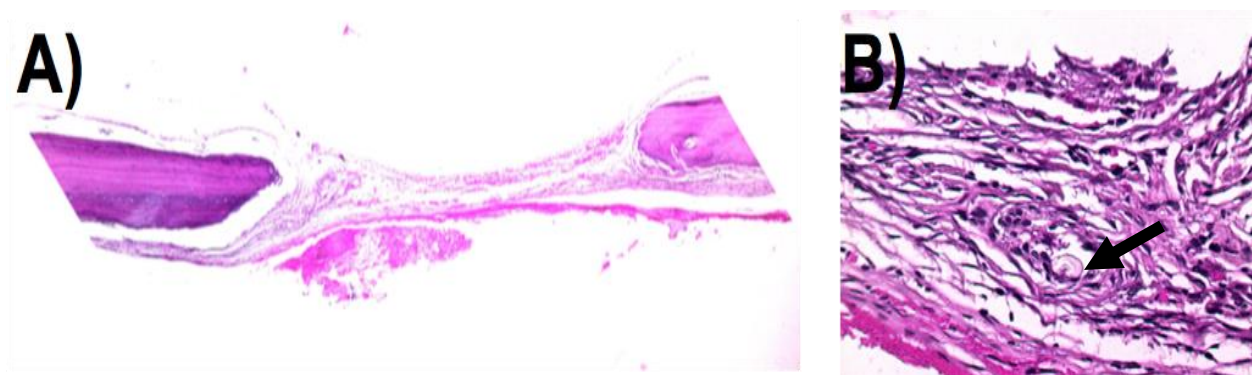


Figura 19. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R2C-21**. A) Se observa fibrina al igual que hemorragia y tejido conectivo, 40x B) Presencia de un cuerpo extraño 400x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

RESULTADOS

Rata 2, óxido de grafeno (R2GrO-21). En la rata 2 en la muestra que se utilizó GrO, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado moderado, se observa presencia leve de neutrófilos y linfocitos. También se observó presencia moderada de macrófagos, angiogénesis y reacción fibroblástica. Se observa también hemorragia y hemosiderina de manera leve. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM en reacción al material y formación de tejido óseo.

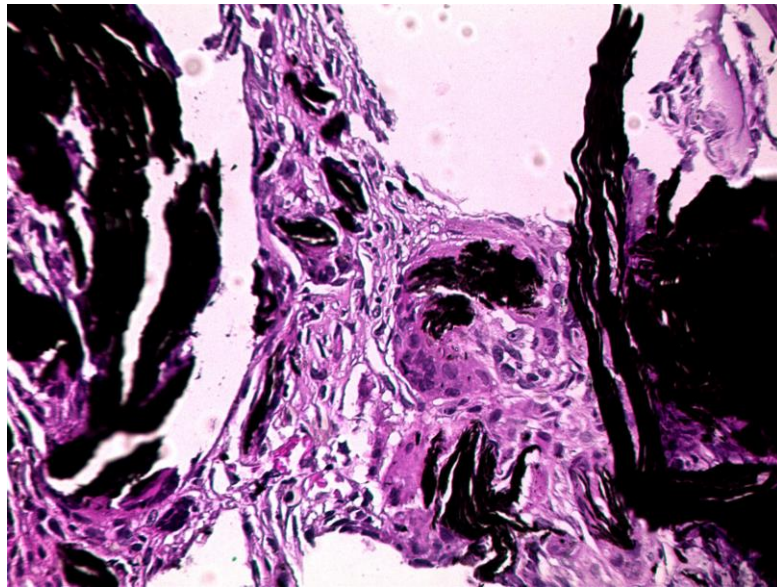


Figura 20. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R2GrO-21**. Se observa tejido conectivo en donde se encuentran también CGM, 400x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 3, Control (R3C-21). En la rata 3 en la muestra de control, se observó un patrón de inflamación aguda con un grado leve, se observa presencia leve de neutrófilos. También se observó presencia leve de angiogénesis y presencia moderada de hemorragia. Se observa también hemosiderina de manera moderada. No se observa algo diferente a los demás controles del grupo II.

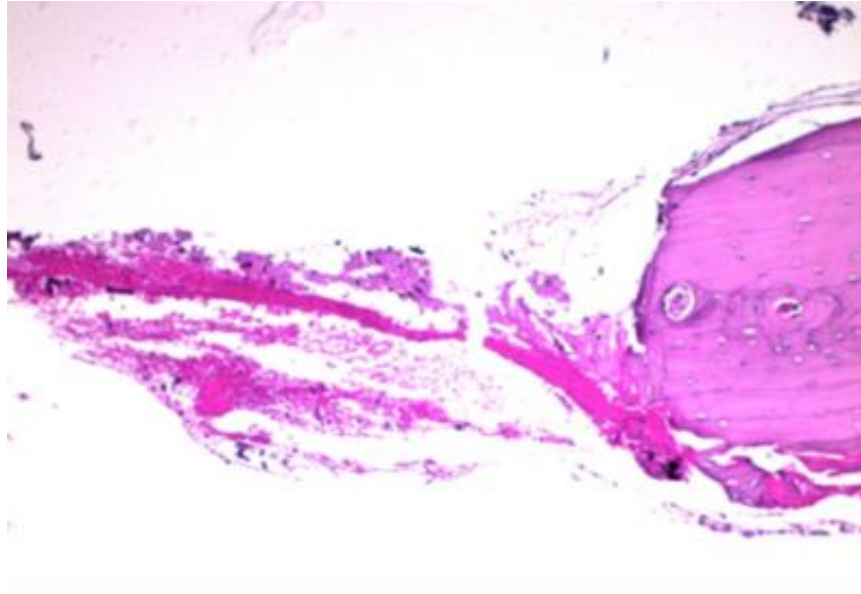


Figura 21. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R3C-21**. Se observa fibrina y hemorragia, 100x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 3, óxido de grafeno calcio (R3GrOCa-21). En la rata 3 en la muestra que se utilizó GrOCa, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado moderado, se observa presencia leve de neutrófilos. También se observó presencia moderada de macrófagos, angiogénesis y reacción fibroblástica. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM en reacción al material. Se pudo observar la misma reacción hacia el material y la formación de tejido fibroblástico por debajo del material al igual que en los demás grupos del grupo II en donde se utiliza GrO así como la formación de tejido óseo.

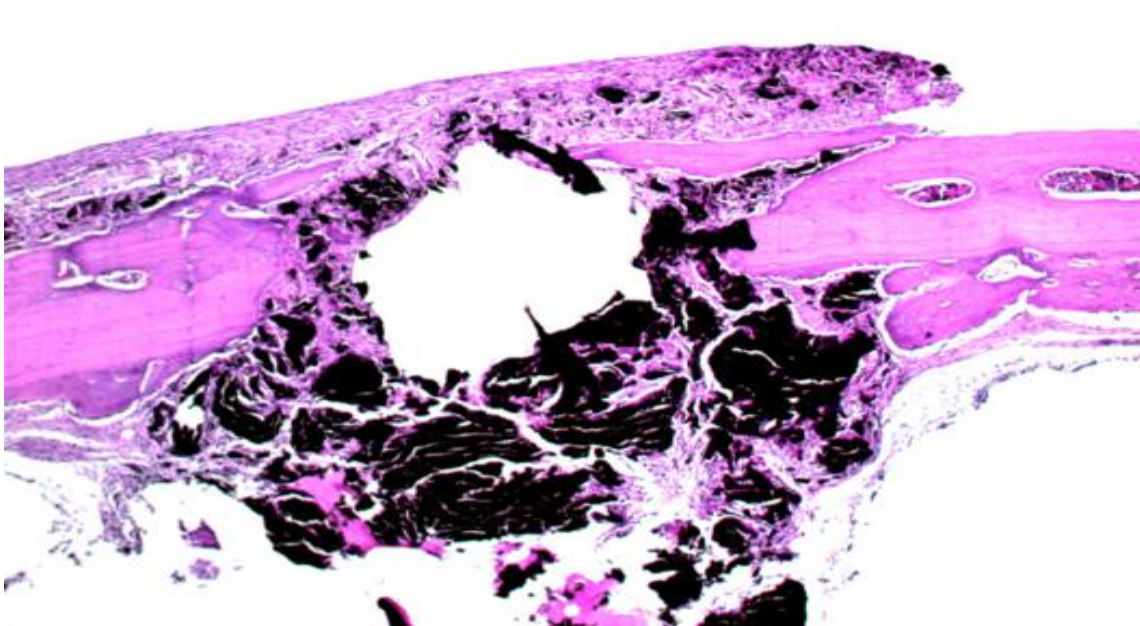


Figura 22. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R3GrOCa-21**. Se observa formación de tejido conectivo entre el injerto al igual que tejido óseo en la periferia, 40x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 4, Control (R4C-21). En la rata 4 en la muestra de control, se observó un patrón de inflamación crónica con un grado leve, se observa presencia leve de linfocitos y presencia moderada de macrófagos. También se observó presencia leve de angiogénesis y de hemorragia. Se observa también hemosiderina y reacción fibroblástica de manera moderada. No se observa algo diferente a los demás controles del grupo II.

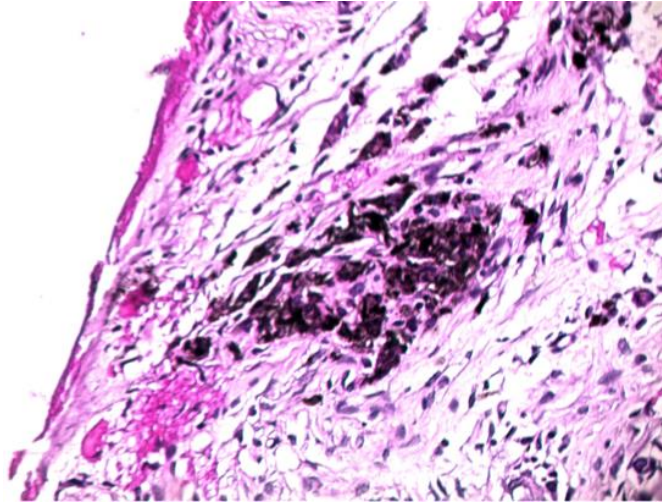


Figura 23. Micrografía de tejido conectivo muestreado de **R4C-21** a 400x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 4, óxido de grafeno calcio (R4GrOCa-21). En la rata 4 en la muestra que se utilizó GrOCa, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado moderado, se observa presencia leve de neutrófilos. También se observó presencia moderada de linfocitos, macrófagos, angiogénesis y reacción fibroblástica. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM en reacción al material. Se pudo observar la misma reacción hacia el material y la formación de tejido fibroblástico por debajo del material al igual que en los demás grupos del grupo II en donde se utiliza GrOCa. Se observó también tejido óseo más organizado.

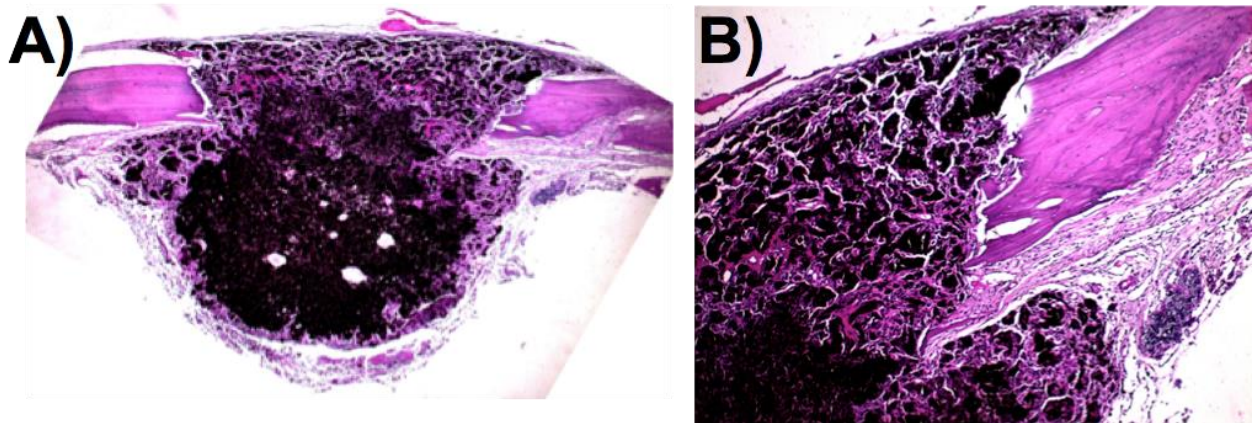


Figura 24. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R4GrOCa-21**. A) Se puede observar la formación de tejido alrededor del injerto, 40x B) Se puede observar la mezcla del injerto con tejido conectivo, 100x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

Rata 5, óxido de grafeno (R5GrO-21). En la rata 5 en la muestra que se utilizó GrO, se observó un patrón de inflamación crónica con un grado moderado, se observa presencia leve de linfocitos. También se observó presencia moderada de macrófagos, angiogénesis y reacción fibroblástica. Se observa también hemorragia leve. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM en reacción al material y al igual que en los demás grupos de GrO se observó formación de tejido óseo en relación al material.

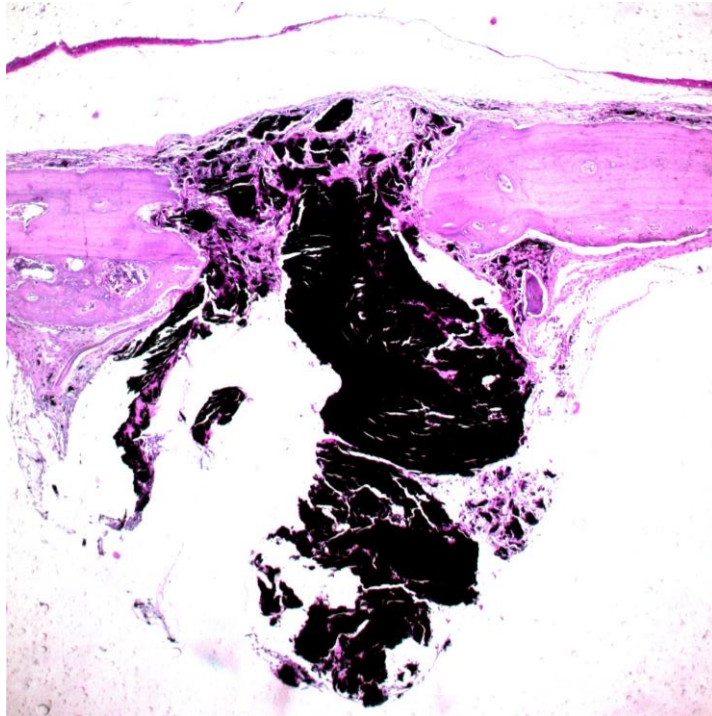


Figura 25. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R5GrO-21**. Se puede observar la mezcla del material con tejido fibroso. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina, 40x.

Rata 5, óxido de grafeno calcio (R5GrOCa-21). En la rata 5 en la muestra que se utilizó GrOCa, se observó un patrón de inflamación mixta con un grado leve, se observa presencia leve de neutrófilos y linfocitos. También se observó presencia moderada de angiogénesis, reacción fibroblástica y de hemorragia. En este grupo se pudo apreciar también la presencia de CGM en reacción al material. Además de observar una presencia severa de macrófagos. Se pudo observar la misma reacción hacia el material y la formación de tejido fibroblástico por debajo del material al igual que en los demás grupos del grupo II en donde se utiliza GrOCa en donde se observó formación de tejido óseo.

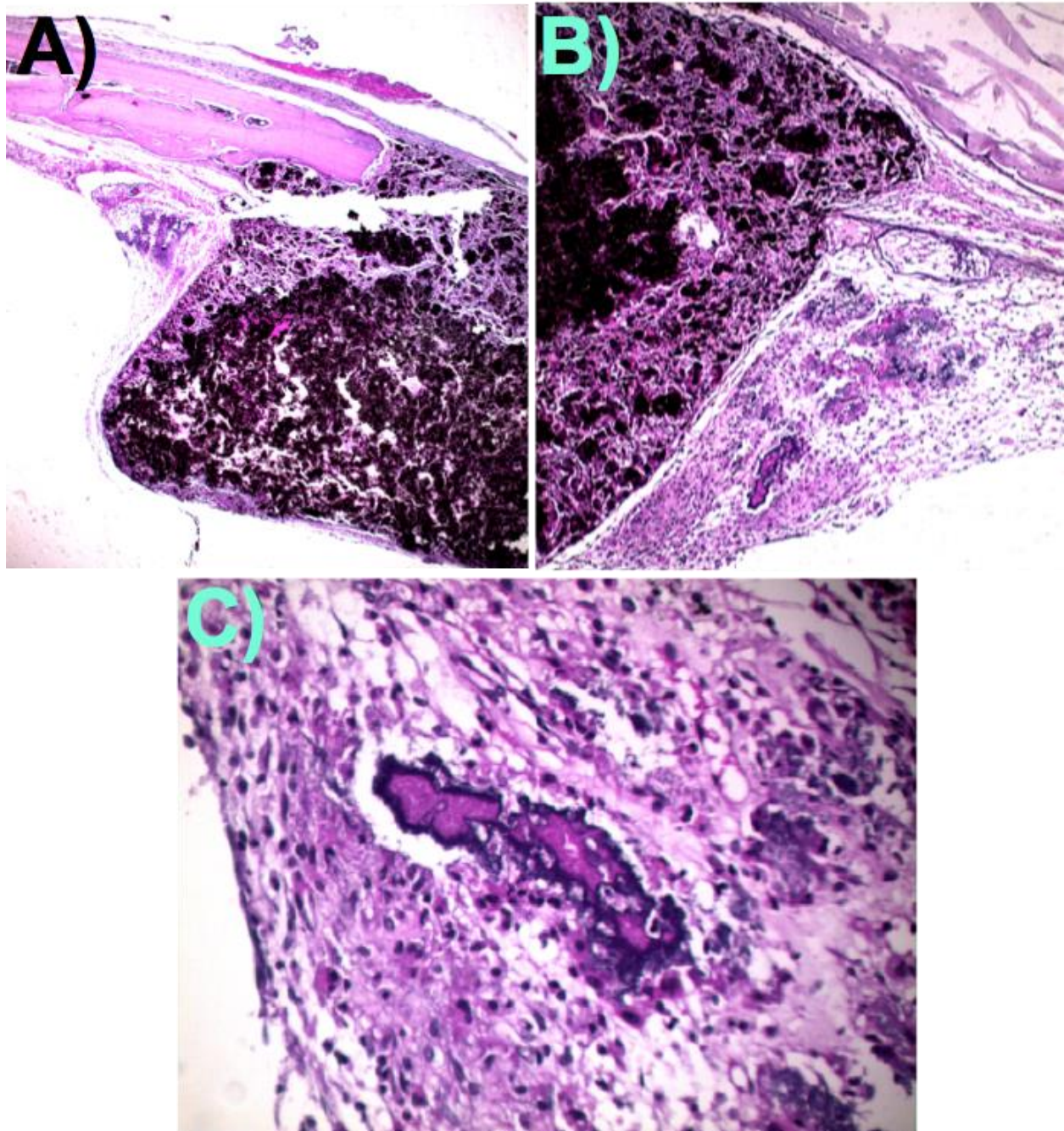


Figura 26. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de **R5GrOCa-21**. A) Se puede observar la mezcla del material con la formación de tejido óseo, 40x. B) Se puede observar la formación de tejido óseo en forma de "cuña" en relación con el injerto, 100x. C) Se puede observar la formación de tejido óseo de una manera más organizada, 400x. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

9.4.2 Respuesta inmunológica

Posterior al procesamiento de las muestras se realizó un cuestionario con la finalidad de facilitar y puntualizar las observaciones captadas en los frotis, sobre células y características relacionadas a la respuesta inmunológica. Los resultados están resumizados en la Figura 27-30 y en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los indicadores relacionados al proceso inflamatorio observadas en las muestras de tejido óseo teñidas con hematoxilina y eosina. CGM: Células Gigantes Multinucleadas.

ID	Patrón de Inflamación	Grado de inflamación	CGM (Respuesta a cuerpo extraño)
R3C-21	Aguda	Leve	No
R1C-21	Mixta	Moderada	No
R2GrO-21	Mixta	Moderada	Sì
R4GrO-9	Mixta	Moderada	Sì
R5GrO-9	Mixta	Moderada	Sì
R2C-21	Crónica	Leve	Sì
R5GrOCa-21	Mixta	Leve	Sì
R1GrO-21	Mixta	Leve	Sì
R3GrOCa-21	Mixta	Moderada	Sì
R5GrOCa-21	Mixta	Moderada	Sì
R4C-9	Aguda	Leve	No
R4C-21	Crónica	Leve	No

RESULTADOS

R4GrOCa-21	Mixta	Moderada	Sì
R5GrO-21	Crónica	Moderada	Sì

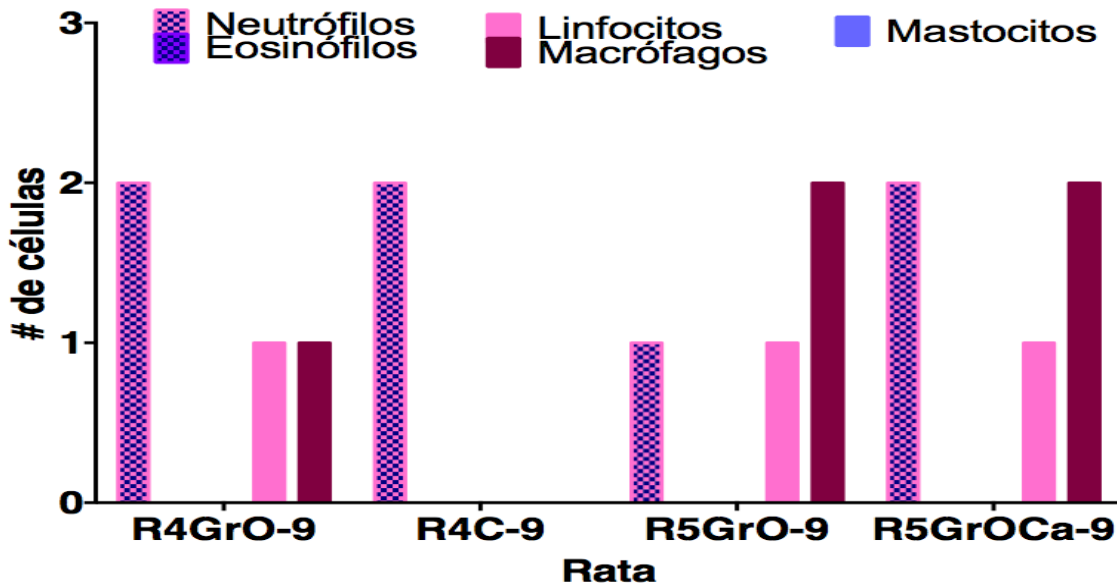


Figure 27. Recuento de las células del linaje inmunológico. Células observadas (Tinción con hematoxilina y eosina) en las muestras de tejido óseo procesadas a los 9 días.

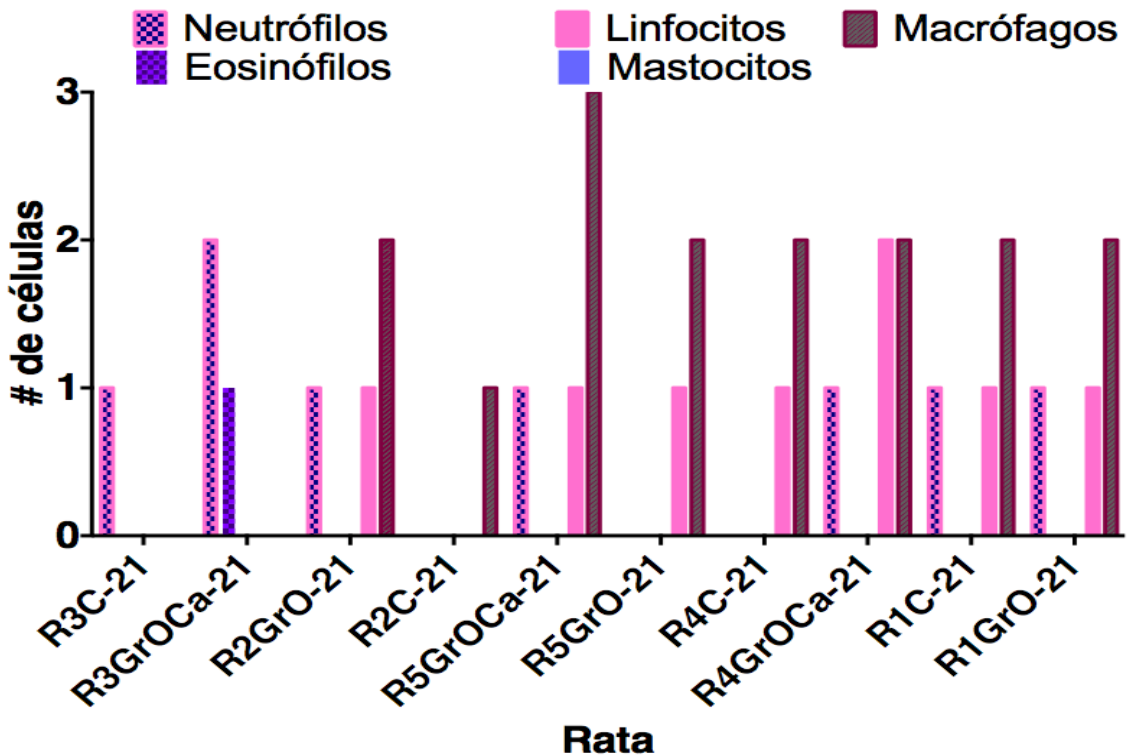


Figure 28. Recuento de las células del linaje inmunológico. Células observadas (Tinción con hematoxilina y eosina) en las muestras de tejido óseo procesadas a los 21 días.

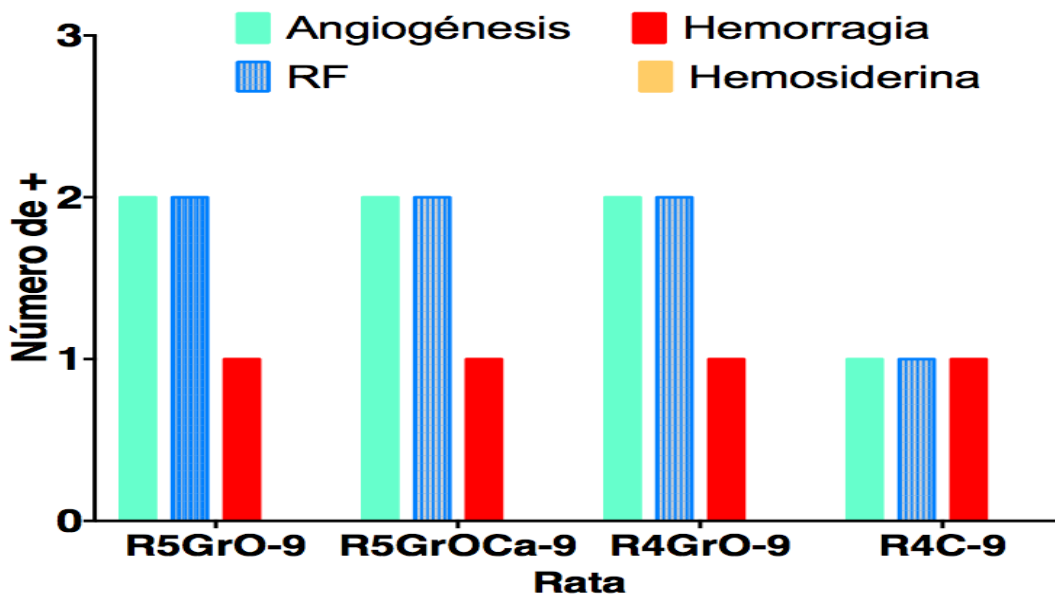


Figure 29. Indicadores la respuesta inmune (Tinción con hematoxilina y eosina) en las muestras de tejido óseo procesadas a los 9 días. RF: Reacción fibroblástica.

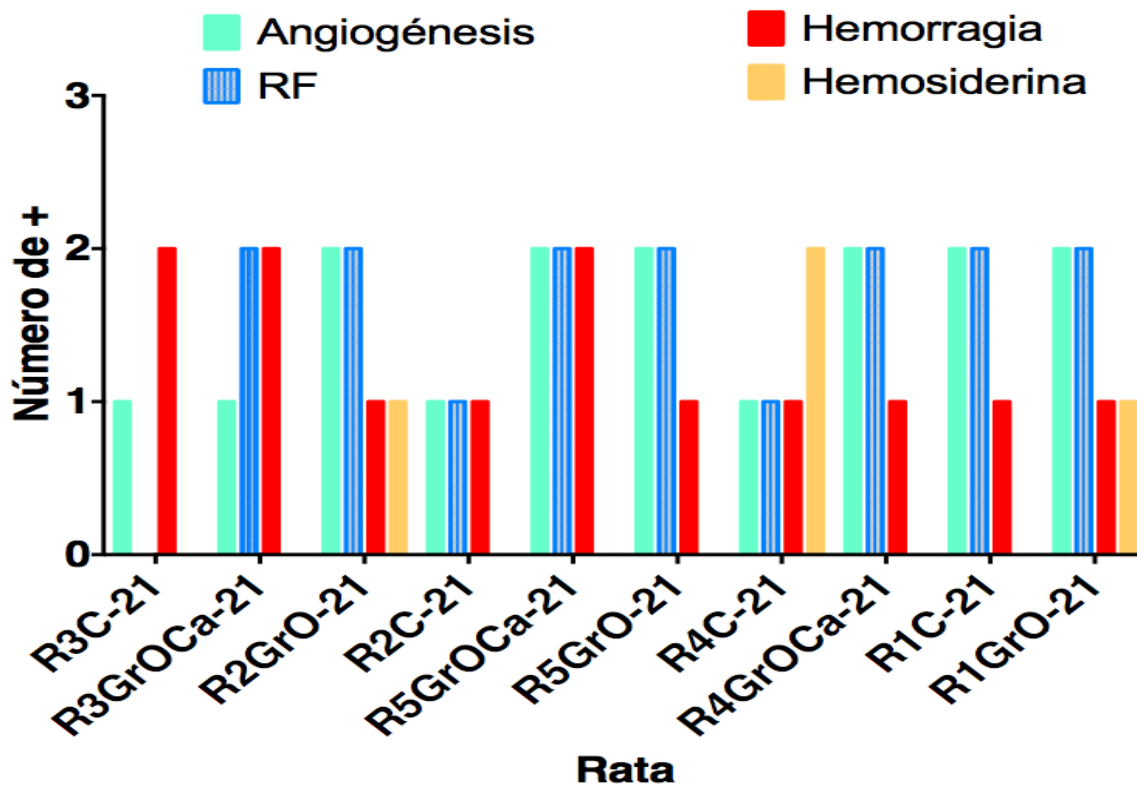


Figure 30. Indicadores de la respuesta inmune (Tinción con hematoxilina y eosina) en las muestras de tejido óseo procesadas a los 21 días. RF: Reacción fibroblástica.

10. DICUSIÓN

Uno de los objetivos de la ingeniería del tejido es mimetizar el proceso natural de reparación del hueso mediante la inserción de células que induzcan la diferenciación osteoblástica. Esto es posible lograr mediante el uso de matrices tridimensionales biocompatibles, bioreabsorbibles y osteoconductoras, que promuevan la unión celular *in vivo*, la migración y la proliferación de células osteogénicas ⁽¹⁰⁴⁾. Los andamios porosos tridimensionales pueden optimizar la regeneración ósea al proporcionar un ambiente apropiado que facilite la migración de células de los tejidos circundantes, la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo de Matriz extracelular ósea (MEC) y lechos vasculares⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁵⁾.

Los andamios potencialmente adecuados para uso en regeneración ósea incluyen cerámicas, como hidroxiapatita, fosfato beta tricálcico⁽¹⁰⁶⁾, y dióxido de titanio ⁽¹⁰⁷⁾; polímeros sintéticos o biológicos, como el ácido poli-láctico ⁽¹⁰⁸⁾, el ácido poliglicólico⁽¹⁰⁹⁾, la policaprolactona ⁽¹¹⁰⁾, el quitosán o el colágeno, y materiales compuestos de los materiales mencionados anteriormente, es decir, cerámica /polímero (hidroxiapatita/ quitosano) ⁽¹¹¹⁻¹¹²⁾. Los materiales cerámicos se han utilizado ampliamente como sustratos de ingeniería del tejido óseo, debido a su alta resistencia, compatibilidad con los tejidos y osteoconductividad. Sin embargo la biodegradación, la dificultad de conformación y fragilidad mecánica, son limitantes importantes para ser considerados materiales ideales en aplicaciones clínicas ⁽¹¹³⁾.

Por otro lado aunque los biomateriales poliméricos, por lo general, son biodegradables y compatibles con tejidos ⁽¹¹⁴⁻¹¹⁵⁾, en muchos casos, muestran características mecánicas deficientes ⁽¹⁰⁹⁾. Con el fin de abordar este problema, nuestro objetivo fue analizar la capacidad de los derivados de grafeno GrO y GrOCa de catalizar la restauración ósea sobre un defecto calvario de tamaño crítico en ratas. En este tipo de estudios es importante que el defecto óseo control no se restaure rápidamente durante el tiempo de análisis. Dos factores importantes son el tamaño del defecto y el periodo de tiempo de evaluación. Con base en eso, se determinó de 9 a 21 días el tiempo de evaluación de formación de hueso y 4mm para el tamaño del defecto. Para el diseño del material se eligió el óxido de grafeno y un derivado. Los efectos

positivos del óxido de grafeno para mejorar y acelerar la regeneración ósea y la osteointegración se ha demostrado en diversos estudios. Sin embargo, el efecto combinado del calcio y el óxido de grafeno sobre los defectos óseos no ha sido explorado *in vivo* antes. Adicionalmente, pocos trabajos hablan sobre el efecto del GrO por sí solo, es decir, en la mayoría de los estudios esta derivatizado con cerámicas y/o polímeros.

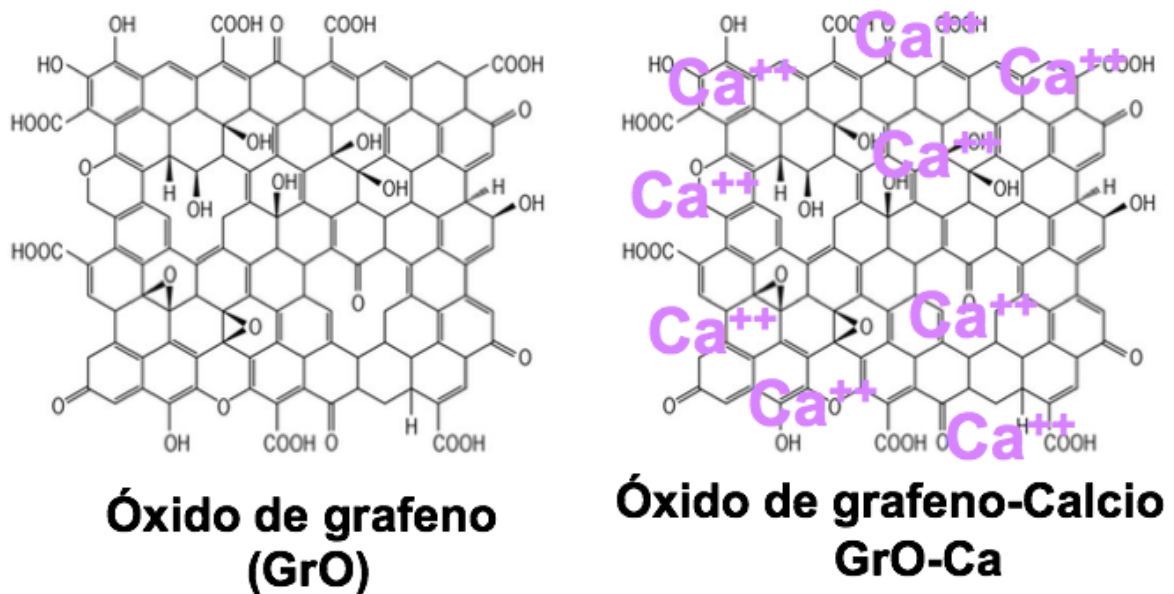


Figura 31. Estructura del óxido de grafeno (GrO) y óxido de grafeno calcio (GrOCa).

Es así como se incluyó el GrO en este estudio, con la finalidad de explorar su efecto en solitario. Los resultados arrojaron que la presencia de óxido de grafeno (GrO y GrOCa) promovió significativamente la regeneración del hueso en ratones injertados a los 9 y 21 días en comparación con los controles (defectos vacíos). Las observaciones histológicas posteriores a la implantación del grafeno en los controles (defectos vacíos), en el mismo lapso de tiempo, mostraron una formación ósea limitada cerca del borde del defecto óseo, con un delgado tejido conjuntivo. Esto confirmó la incapacidad de los mecanismos endógenos para regenerar totalmente defectos de este tamaño, sin interferencias exógenas durante el tiempo de análisis. Por otro lado, el

GrOCa fue solo ligeramente superior al GrO, lo que confirma la propiedades osteogénicas GrO por sí solo.

El análisis también reveló que el hueso recién formado aumentó desde la periferia hasta el centro del defecto óseo, en lugar de solo en la frontera, como se observa en algunos andamios poliméricos ⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾. Una posible explicación es que tanto el GrO y el GrOCa favorecen la diferenciación osteogénica de las células progenitoras y mejorar la formación ósea, como resultado de interacciones hidrófobas y electrostáticas con proteínas ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾.

Las áreas que recibieron GrO y GrOCa mostraron una diferenciación ósea íntimamente asociada con el injerto, lo que demuestra las propiedades osteoconductoras del material. En el día 9 postoperatorio, se observaron grandes rastros del material de injerto (GrO/GrOCa) sin estar mezclado con algún otro tejido, y en el día postoperatorio 20, las partículas del material se mezclaron completamente. Esta infiltración ósea puede ser el resultado de la porosidad biomaterial (tamaño de poro y número de poros), GrO y GrOCa, que permite interconectividad, es decir, infiltración celular, unión, proliferación, diferenciación y desarrollo e integración de ECM con hueso huésped ⁽¹²⁰⁾ y por consecuencia formación de nuevo tejido. Al mismo tiempo

Se demostró que la biocompatibilidad de los materiales analizados era adecuada una vez que la respuesta inflamatoria era la esperada para este tipo de injertos y la organización de los tejidos era la adecuada.

El presente estudio mostró que el GrO y GrOCa proporcionaron mejores resultados para el tratamiento de defectos óseos en cráneos de ratas ya que se observó formación de tejido óseo en relación a este material, sin embargo se tienen que realizar más estudios como determinación de marcadores nucleares implicados en

DISCUSIÓN

el crecimiento celular, marcadores inmunológicos, implicados en proceso inflamatorio, aumentar el tiempo de estudio, utilizar ratas seniles o enfermas etc.

11. CONCLUSIONES

El presente estudio fue diseñado para analizar histológicamente la influencia de GrO y GrOCa en la curación ósea en defectos creados quirúrgicamente en cráneo de rata. El hueso recién formado en el defecto quirúrgico se evaluó mediante análisis histológico visual y cuestionario previamente elaborado. Todos los grupos experimentales demostraron una curación ósea superior en comparación con los grupos control a los 9 y 21 días después de las cirugías.

Además, se demostró que la biocompatibilidad de los materiales analizados era adecuada una vez que la respuesta inflamatoria y la organización de los tejidos eran similares al control según lo observado en un estudio anterior ⁽⁹²⁾. Los defectos de control no fueron reparados completamente por el hueso en ninguno de los dos puntos de tiempo, lo que demuestra que los defectos tenían un tamaño crítico. Los defectos de tamaño crítico se definen como los defectos de un tamaño que no permiten la regeneración/curación ósea espontánea durante la vida del animal ⁽⁹³⁾.

En el presente estudio, no se repararon totalmente las muestras en el grupo de control a los 9 o 21 días, lo que indica la creación de defectos de tamaño crítico (4 mm de diámetro), que son esenciales para la evaluación crítica de biomateriales.

Las áreas que recibieron GrO y GrOCa mostraron una diferenciación ósea íntimamente asociada con el injerto, lo que demuestra las propiedades osteoconductoras del material. En el día 9 postoperatorio, se observaron grandes rastros del material de injerto (GrO/GrOCa) sin estar mezclado con algún otro tejido, y en el día postoperatorio 20, las partículas del material se mezclaron completamente, según el informe anterior ⁽⁹²⁾.

Se observaron resultados similares con el vidrio bioactivo (BioGran Orthovitat, Malvern, PA, EE. UU.) Que muestra una diferenciación ósea íntimamente asociada con las partículas de vidrio bioactivo, lo que demuestra las propiedades osteoconductoras

CONCLUSIONES

del material ⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾. El vidrio bioactivo, especialmente en su forma granular, es un material aloplástico que se ha utilizado ampliamente para rellenar defectos óseos ^(97,98).

Los esfuerzos actuales se centran en el desarrollo de estrategias efectivas para la ingeniería de tejidos óseos, pero predecimos que la discusión futura se centrará en la identificación de las estrategias de ingeniería de tejidos óseos más rentables. Aunque la carrera para hacer de la ingeniería de tejidos óseos una realidad clínica está bien justificada, aún existen desafíos y limitaciones importantes en este campo. ⁽¹⁰³⁾

12. AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo de tesis a mi familia, gracias por su gran apoyo incondicional.

Agradezco a la Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez, coordinadora de la Especialidad en Endodoncia y Co-directora de tesis, brindarme la oportunidad de pertenecer a este posgrado, por sus enseñanzas y especialmente por creer en mí.

Un especial agradecimiento al Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántar, mi Director de Tesis, por su apoyo en todo momento, su orientación y su disposición para la realización de este trabajo.

A mi Co-Directora de tesis, la Dra. Eva Viviana Sarmiento Gutiérrez, por su esfuerzo, tiempo, paciencia, dedicación y motivación a dar siempre lo mejor.

A mi Co-Director de tesis M.C. Edgar Ramiro Méndez Sánchez, por todo su apoyo, confianza y consejos.

A la M.C. María Goretty Espinoza Montoya por su apoyo y motivación para entrar al posgrado.

También quiero agradecer a todos los docentes que han participado en mi formación, tanto a mis maestros de licenciatura como de posgrado.

A CONACYT por la beca otorgada.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. •Mondragón Espinoza JD. Endodoncia. México: Interamericana-Mc Graw Hill; 1995. 250 p.
2. Canalda C. Endodoncia Técnicas clínicas y bases científicas. 2da ed. Elsevier, editor.
3. Bernabé PFE, Melo LGN, Cintra LTA, Gomes-Filho JE, Dezan E, Nagata MJH. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: A histological and histometric study in rat tibiae. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(3):384–8.
4. Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, et al. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano.* 2011;5(6):4670–8.
5. Carmo ABX do, Sartoretto SC, Alves ATNN, Granjeiro JM, Miguel FB, Calasans-Maia J, et al. Alveolar bone repair with strontium- containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. *J Appl Oral Sci.* 2018;26(0):1–9.
6. ROSS MH y WP. *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular.* Ed. Paname. 2013.
7. Vacanti RLJP. *Tissue Engineering.* JSTOR. 1993;260(5110):920–6.
8. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2008;29(13):1989–2006.
9. Bártolo PJ, Chua CK, Almeida HA, Chou SM, Lim ASC. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends. *Virtual Phys Prototyp.* 2009;4(4):203–16.
10. Bartolo P, Kruth JP, Silva J, Levy G, Malshe A RK et al. Biomedical production of implants by additive electro-chemical and physical processes. *CIRP Annals - Manufacturing Technology.* 2012;61(2):635–55.
11. Vaezi M, Yang S. Extrusion-based additive manufacturing of PEEK for biomedical applications. *Virtual Phys Prototyp.* 2015;10(3):123–35.
12. Dean D, Mott E, Luo X, Busso M, Wang MO, Vorwald C, et al. Multiple initiators and dyes for continuous Digital Light Processing (cDLP) additive manufacture of

- resorbable bone tissue engineering scaffolds: A new method and new material to fabricate resorbable scaffold for bone tissue engineering via continuous Dig. Virtual Phys Prototyp [Internet]. 2014;9(1):3–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17452759.2013.873337>
13. B. Bidanda PJB (Eds. . Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications ▶ Brings together all the important aspects of virtual and rapid prototyping relative to medical applications in a cohesive manner ▶ Provides a comprehensive overview of virtual prototyping a. 2008;49(0):6221.
 14. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006;10(3):569–76.
 15. Nandi S.K., S. R, P. M, B. K, D.K. D, D. B. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* [Internet]. 2010;132(July):15–30. Available from: http://www.ijmr.org.in/temp/IndianJMedRes132115-234802_063120.pdf
 16. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;(360):71–86.
 17. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int J Polym Sci*. 2011;2011(ii).
 18. Antonios G. Mikos*, Amy J. Thorsen, Lisa A. Czerwonka YB and, T RL. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer (Guildf)*. 1994;35:1068–1077.
 19. Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*. 2007;28(9):1664–71.
 20. Sa, M.-W.; Kim JY. Effect of various blending ratios on the cell characteristics of PCL and PLGA scaffolds fabricated by polymer deposition system. *Int J Precis Eng Manuf*. 2013;14:649–655.
 21. Loh QL, Choong C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2013;19(6):485–502. Available from:

- <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2012.0437>
22. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater Today*. 2004;7(5):30–40.
 23. Kretlow JD, Mikos AG. Review: Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng*. 2007;13(5):927–38.
 24. Moradi A, Dalilottojari A, Pinguan-Murphy B, Djordjevic I. Fabrication and characterization of elastomeric scaffolds comprised of a citric acid-based polyester/hydroxyapatite microcomposite. *Mater Des [Internet]*. 2013;50:446–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2013.03.026>
 25. Ali Akbari Ghavimi S, Ebrahimzadeh MH, Solati-Hashjin M, Osman A AN. Polycaprolactone/ starch composite: Fabrication, structure, properties, and applications. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(7):2482–98.
 26. Ali Akbari Ghavimi S, Ebrahimzadeh MH, Shokrgozar MA, Solati-Hashjin M, Abu Osman NA. Effect of starch content on the biodegradation of polycaprolactone/starch composite for fabricating in situ pore-forming scaffolds. *Polym Test [Internet]*. 2015;43:94–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymertesting.2015.02.012>
 27. Ishaug SL, Yaszemski MJ, Bizios R, Mikos AG. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(12):1445–53.
 28. M W. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003;24(13):2133–51.
 29. Short AR, Koralla D, Deshmukh A, Wissel B, Stocker B, Calhoun M et al. Hydrogels that allow and facilitate bone repair, remodeling, and regeneration. *J Mater Chem B*. 2015;3(40):7818-30.
 30. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ LJ. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Massachusetts Acad Press. 2004;
 31. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4–5):339–59.
 32. A. M. Development of bovine cartilage extracellular matrix as a potential scaffold for chondrogenic induction of human dermal fibroblasts. [Doctoral Diss Kuala Lumpur, Malaysia Univ Malaya. 2015;
 33. Moradi A, Ataollahi F, Sayar K, Pramanik S, Chong PP, Khalil AA, et al.

- Chondrogenic potential of physically treated bovine cartilage matrix derived porous scaffolds on human dermal fibroblast cells. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2016;104(1):245–56.
34. Pei M, Li J, Shoukry M, Zhang Y. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. *Eur Cells Mater*. 2011;22:333–43.
 35. Yang Q, Peng J, Lu SB, Guo QY, Zhao B, Zhang L, et al. Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(23):3930–8.
 36. Koob S, Torio-Padron N, Stark GB, Hannig C, Stankovic Z, Finkenzeller G. Bone Formation and Neovascularization Mediated by Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Cells in Critical-Sized Calvarial Defects. *Tissue Eng Part A*. 2010;17(3–4):311–21.
 37. Cowley SP AL. Hernias through donor sites for iliac-bone grafts. *J Bone Jt Surg Am*. 1983;65(7):1023–5.
 38. Kao ST SD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007;19(4):513–21.
 39. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res*. 1999;17(2):205–13.
 40. Yarlagadda, Prasad K.D.V.; | Chandrasekharan, Margam | Shyan JYM. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng*. 2005;15(3):159–77.
 41. Liu X MP. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2004;32(3):477–86.
 42. Biltz RM PE. The chemical anatomy of bone: I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. *J Bone Jt Surg Am*. 1969;51(3):456–66.
 43. Ducheyne P QQ. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999;20(23–24):2287–303.
 44. Machado CP, Sartoretto SC, Alves AT, Lima IB, Rossi AM, Granjeiro JM et al.

- Histomorphometric evaluation of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite as bone substitute in sheep. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):e45–e45.
45. Hasegawa M, Doi Y UA. Cell-mediated bioresorption of sintered carbonate apatite in rabbits. *J Bone Jt Surg Br.* 2003;85(1):142–147.
 46. Resende RF, Fernandes GV, Santos SR, Rossi AM, Lima I, Granjeiro JM et al. Long-term biocompatibility evaluation of 0.5 % zinc containing hydroxyapatite in rabbits. *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24(6):1455–1463.
 47. Hesaraki S, Nazarian H, Pourbaghi-Masouleh M BS. Comparative study of mesenchymal stem cells osteogenic differentiation on low-temperature biomineralized nanocrystalline carbonated hydroxyapatite and sintered hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(1):108–118.
 48. Liao S, Watari F, Xu G, Ngiam M, Ramakrishna S CC. Morphological effects of variant carbonates in biomimetic hydroxyapatite. *Mater Lett.* 2007;61(17):3624–3628.
 49. SV D. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater.* 2010;6(3):715–734.
 50. Cox SC, Jamshidi P, Grover LM MK. Low temperature aqueous precipitation of needle-like nanophase hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(1):37–46.
 51. Kokubo T, Kim HM KM. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials.* 2003;24(13):2161–75.
 52. Cascone M, Barbani N, Cristallini C, Giusti P, Ciardelli G LL. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12(3):267–81.
 53. Kang HG, Kim SY LY. Novel porous gelatin scaffolds by overrun/particle leaching process for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;79(2):388-97.
 54. Roether J, Boccaccini AR, Hench L, Maquet V, Gautier S JR. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2002;23(18):3871–8.
 55. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Meakawa T KD. Polymeric scaffolds in tissue

- engineering application: a review. . *Int J Polym Sci.* 2011;2011(19):290602.
56. Woo BH, Kostanski JW, Gebrekidan S, Dani BA, Thanoo B DP. Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly (D, L-lactide) leuprolide microspheres. *J Control Release.* 2001;75(3):307–15.
 57. Du C, Cui F, Zhu X de GK. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res.* 1999;44(4):407–15.
 58. Bigi A, Boanini E, Panzavolta S, Roveri N RK. Bonelike apatite growth on hydroxyapatite–gelatin sponges from simulated body fluid. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(4):709–15.
 59. Banerjee SS, Tarafder S, Davies NM, Bandyopadhyay A BS. Understanding the influence of MgO and SrO binary doping on the mechanical and biological properties of β -TCP ceramics. *Acta Biomater.* 2010;6(10):4167–74.
 60. Li F, Feng QL, Cui FZ, Li HD SH. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. *Surf Coat Technol.* 2002;154(1):88–93.
 61. Farack J, Wolf-Brandstetter C, Glorius S, Nies B, Standke G, Quadbeck P et al. The effect of perfusion culture on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells on biocorrosible bone replacement material. *Mater Sci Engin.* 2011;176(20):1767–72.
 62. Hermawan H, Dubé D MD. Degradable metallic biomaterials: design and development of Fe-Mn alloys for stents. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(1):1–11.
 63. Quadbeck P, Hauser R, Kümmel K, Standke G, Stephani G, Nies B et al. Iron based cellular metals for degradable synthetic bone replacement. *PM2010 World Congr Florenz, Italy.* 2010;
 64. Yusop A, Bakir A, Shaharom NA, Abdul Kadir M HH. Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review. *Int J Biomater.* 2012;2012(1):641430.
 65. Bobyn J, Stackpool GJ, Hacking SA, Tanzer M KJ. Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. *Bone Jt Surg Br.* 1999;81(5):907–14.
 66. Bobyn JD, Toh KK, Hacking SA, Tanzer M KJ. Tissue response to porous tantalum acetabular cups: a canine model. *J Arthroplast.* 1999;14(3):347–54.
 67. Adams JE, Zobitz ME, Reach JS Jr, An KN, Lewallen DG SS. Canine carpal joint

- fusion: a model for four-corner arthrodesis using a porous tantalum implant. *J Hand Surg Am.* 2005;30(6):1128–35.
68. Meneghini RM, Lewallen DG HA. Use of porous tantalum metaphyseal cones for severe tibial bone loss during revision total knee replacement: surgical technique. *J Bone Jt Surg Am.* 2009;91(Suppl 2 Pt 1):131–8.
69. Vehof JW, Spauwen PH JJ. Bone formation in calcium-phosphate-coated titanium mesh. *Biomaterials.* 2000;21(19):2003–9.
70. Wu C, Zhou Y, Fan W, Han P, Chang J, Yuen J et al. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2012;33(7):2076–85.
71. Kim H, Jiao A, Hwang N et al. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:536.
72. Lee C., X. Wei, J. W. Kysar and JH. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science (80-).* 2008;321(5887):385–388.
73. Khare, R., S. L. Mielke JTP et al. “Coupled quantum mechanical/molecular mechanical modeling of the fracture of defective carbon nanotubes and graphene sheets. *Phys Rev B.* 2007;75(7):Article ID075412.
74. Loh K. P., Q. Bao, P. K. Ang and JY. The chemistry of graphene. *J Mater Chem.* 2010;20(12):2277–2289.
75. Song Y. J., W. L. Wei and XGQ. Colorimetric biosensin using smart materials. *Adv Mater.* 2011;23(37):4215–4236.
76. Liu FL and Z. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine.* 2011;6(2):317–324.
77. Goenka, S., V. Sant and SS. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J Control Release.* 2014;173(1):75–88.
78. Liu J., L. Cui and DL. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.* 2013;9(12):9243–9257.
79. Depan D, Misra RDK. The interplay between nanostructured carbon-grafted chitosan scaffolds and protein adsorption on the cellular response of osteoblasts: Structure-function property relationship. *Acta Biomater [Internet].* 2013;9(4):6084–

94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.12.019>
80. Depan D., B. Girase, J. S. Shah and RDKM. Structure-process-property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds. *Acta Biomater.* 2011;7(9):3432–3445.
81. Georgakilas V, Otyepka M, Bourlinos AB, Chandra V, Kim N, Kemp KC, et al. Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approach. *Chem Rev.* 2012;112(11):6156–214.
82. Gao W. The chemistry of graphene oxide. *Graphene Oxide Reduct Recipes, Spectrosc Appl.* 2015;61–95.
83. Ryoo SR, Kim YK, Kim MH, Min DH. Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: Proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies. *ACS Nano.* 2010;4(11):6587–98.
84. Akhavan O, Ghaderi E. Graphene nanomesh promises extremely efficient in vivo photothermal therapy. *Small.* 2013;9(21):3593–601.
85. Kalbacova M, Broz A, Kong J, Kalbac M. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. *Carbon N Y [Internet].* 2010;48(15):4323–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2010.07.045>
86. Ferrari AC, Meyer JC, Scardaci V, Casiraghi C, Lazzeri M, Mauri F, et al. Raman spectrum of graphene and graphene layers. *Phys Rev Lett [Internet].* 2006;97(18):187401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17155573>
87. Alcolea C, Director S, Ballesteros Y, Madrid I. Obtención De Grafeno Mediante Métodos Químicos De Exfoliación Autorización Para La Digitalización, Depósito Y Divulgación En Acceso Restringido De Documentación. *Esc Técnica Super Ing.* 2013;13–133.
88. Frank IW, Tanenbaum DM, van der Zande AM, McEuen PL. Mechanical properties of suspended graphene sheets. *J Vac Sci Technol B Microelectron Nanom Struct.* 2007;25(6):2558.
89. Zhang Y, Nayak TR, Hong H, Cai W. Graphene: A versatile nanoplatform for

- biomedical applications. *Nanoscale*. 2012;4(13):3833–42.
90. Chung C, Kim YK, Shin D, Ryoo SR, Hong BH, Min DH. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Acc Chem Res*. 2013;46(10):2211–24.
91. Zhang L, Lu Z, Zhao Q, Huang J, Shen H, Zhang Z. Enhanced Chemotherapy Efficacy by Sequential Delivery of siRNA and Anticancer Drugs Using PEI-Grafted Graphene Oxide. *Small*. 2011;7(4):460–4.
92. Marquez de Martinez Gerbi ME, Barbosa Pinheiro AL, de Assis Limeira, Jr. F, Marzola C, Pedreira Ramalho LM, Arruda Carneiro Ponzi E, et al. Assessment of bone repair associated to the use of organic bovine bone and membrane irradiated with 830nm. *Lasers Dent IX*. 2003;4950(4):156.
93. Schmitz, J.P. & Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunions. *Clin Orthop*. 1986;205:299–308.
94. Schepers E, Ducheyne P. Application of bioactive glass particulates as a filler for bone lesions. 1991;14:301. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0025842075&partnerID=40&md5=3368c8b5a9bcbf33a944025e119a18fb>
95. Melo LGN, Nagata MJH, Bosco AF, Ribeiro LLG, Leite CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials: A histological and histometric study in rat tibias. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(6):683–91.
96. Ribeiro, L.L., Bosco, A.F., Nagata, M.J. & de Melo LG. Influence of bioactive glass and/or acellular dermal matrix on bone healing of surgically created defects in rat tibiae: a histological and histometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23:811–817.
97. Hench, L.L. & Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science* (80-). 1984;226:630–636.
98. Schepers, E.J.G., Ducheyne, P., Barbier, L. & Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dent*. 1993;2:151–156.
99. Pinto, L.P., Brito, J.H.M. & Gerhardt MO. Avaliação histológica do processo de reparo ósseo na presença da proteína morfogenética óssea (Gen-Pro)

- associada com umamembrana biolóica (Gen-Derm). *Rev Bras Cir Prótese Implant.* 2003;10:25– 32.
100. Bornstein, M.M., Bosshardt, D. & Buser D. Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: a comparative histomorphometric study in the dog mandible. *J Periodontol.* 2007;78:1943–1953.
 101. Llambe's, F., Silvestre, F.J. & Caffesse R. Vertical guided bone regeneration with bioabsorbable barriers. *J Periodontol.* 2007;78:2036–2042.
 102. Zubery, Y., Goldlust, A., Alves, A. & Nir E. Ossification of a novel cross-linked porcine collagen barrier in guided bone regeneration in dogs. *J Periodontol.* 2007;78:112–121.
 103. Shadjou N, Hasanzadeh M, Khalilzadeh B. Graphene based scaffolds on bone tissue engineering. *Bioengineered* [Internet]. 2018;9(1):38–47. Available from: <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1373539>
 104. Wu, S., Liu, X., Yeung, K., Liu, C. & Yang, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering R* 80, 1–36 (2014).
 105. Asti, A. & Gioglio, L. Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *Int J Artif Organs* 37, 187–205 (2014).
 106. Tadokoro, M. et al. Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and β -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 6, 253–260 (2012).
 107. Haugen, H. J. et al. Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model. *Acta Biomaterialia* 9, 5390–5399 (2013).
 108. Whited, B. M., Whitney, J. R., Hofmann, M. C., Xu, Y. & Rylander, M. N. Pre osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds. *Biomaterials* 32, 2294–2304 (2011).
 109. Ben-David, D. et al. Low dose BMP-2 treatment for bone repair using a PEGylated fibrinogen hydrogel matrix. *Biomaterials* 34, 2902–2910 (2013).
 110. Vaquette, C., Ivanovski, S., Hamlet, S. M. & Hutmacher, D. W. Effect of culture

- conditions and calcium phosphate coating on ectopic bone formation. *Biomaterials* 34, 5538–5551 (2013).
111. Liu, H. et al. The promotion of bone regeneration by nanofibrous hydroxyapatite/chitosan scaffolds by effects on integrin-BMP/Smad signaling pathway in BMSCs. *Biomaterials* 34, 4404–17 (2013).
112. Lee, J. S. et al. In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules* 67, 360–366 (2014).
113. Gao, C. et al. Current Progress in Bioactive Ceramic Scaffolds for Bone Repair and Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 4714–4732 (2014).
114. Cheung, H. Y., Lau, K. T., Lu, T. P. & Hui, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites: Part B* 38, 291–300 (2007).
115. Peled, E., Boss, J., Bejar, J., Zinman, C. & Seliktar, D. A novel poly(ethylene glycol)-fibrinogen hydrogel for tibial segmental defect repair in a rat model. *J Biomed Mater Res A* 80, 874–84 (2007).
116. La, W. G. et al. Delivery of a therapeutic protein for bone regeneration from a substrate coated with graphene oxide. *Small* 9, 4051–60 (2013).
117. Nayak, T. R. et al. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano* 5, 4670–8 (2011).
118. Li, D. & Kaner, R. B. Materials science. Graphene-based materials. *Science* 320, 1170–1 (2008).
119. Hong, J. et al. Graphene multilayers as gates for multi-week sequential release of proteins from surfaces. *ACS Nano* 6, 81–8 (2012).
120. Dinescu, S. et al. In vitro cytocompatibility evaluation of chitosan/graphene oxide 3D scaffold composites designed for bone tissue engineering. *Biomed. Mater. Eng.* 24, 2249–2256 (2014).