

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

PROGRAMA DE ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA



**ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ÓXIDO DE GRAFENO (GO) Y
ÓXIDO DE GRAFENO (GOCa) CON CALCIO COMO
ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA.**

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

PRESENTA

C.D. KEREN DENISSE BORQUES DE LA PARRA

PRESIDENTE

DRA. ANA GABIELA CARRILLO VÁRGUEZ

SINODAL

SINODAL

DR. MIGUEL ANGEL CADENA ALCÁNTAR

M.C. EDGAR RAMIRO MÉNDEZ SÁNCHEZ

SINODAL

DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO GUTIÉRREZ

TIJUANA, BAJA CALIFORNIA; MÉXICO

SEPTIEMBRE DEL 2020

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a; 30 de julio de 2020

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ÓXIDO DE GRAFENO (GO) Y ÓXIDO DE GRAFENO (GOCa) CON CALCIO COMO ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA.**

Propuesto por la **C.D. KEREN DENISSE BORQUES DE LA PARRA**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE


DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VARGUEZ
PRESIDENTE

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a; 30 de julio de 2020

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ÓXIDO DE GRAFENO (GO) Y ÓXIDO DE GRAFENO (GOCa) CON CALCIO COMO ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA.**

Propuesto por la **C.D. KEREN DENISSE BORQUES DE LA PARRA**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE


DR. MIGUEL ANGEL CADENA ALCÁNTAR
SINODAL

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

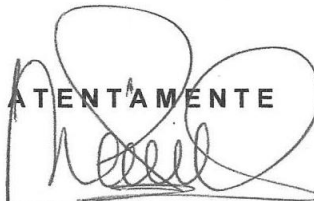
Tijuana, Baja California a; 30 de julio de 2020

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ÓXIDO DE GRAFENO (GO) Y ÓXIDO DE GRAFENO (GOCa) CON CALCIO COMO ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA.**

Propuesto por la **C.D. KEREN DENISSE BORQUES DE LA PARRA**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE


M.C. EDGAR RAMIRO MENDEZ SANCHEZ
SINODAL

Ccp.- Archivo.

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA TIJUANA
ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA**

Tijuana, Baja California a; 30 de julio de 2020

AL COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Por medio del presente, me permito informar que el trabajo: **ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ÓXIDO DE GRAFENO (GO) Y ÓXIDO DE GRAFENO (GOCa) CON CALCIO COMO ANDAMIOS CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA.**

Propuesto por la **C.D. KEREN DENISSE BORQUES DE LA PARRA**, fue revisado y ha sido aprobado para su impresión.

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

ATENTAMENTE



**DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO GUTIÉRREZ
SINODAL**

Ccp.- Archivo.

**ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL ÓXIDO DE GRAFENO (GO) Y
ÓXIDO DE GRAFENO (GOCa) CON CALCIO COMO ANDAMIOS
CELULARES PARA LA RESTAURACIÓN ÓSEA.**

PRESENTA

C.D. Keren Denisse Borques De La Parra

PRESIDENTE

(DIRECTORA DEL PROYECTO)

Dra. Ana Gabriela Carrillo Vázquez

SINODALES

(CO-DIRECTORES DEL PROYECTO)

DR. MIGUEL ANGEL CADENA
ALCÁNTAR

M.C. EDGAR RAMIRO MÉNDEZ
SÁNCHEZ

DRA. EVA VIVIANA SARMIENTO GUTIÉRREZ

Tijuana, Baja California, 11 de septiembre de 2020

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo de tesis principalmente a mi familia y a mis padres por ser los principales promotores de mis metas y mis sueños, gracias a ellos por cada día que han confiado y creído en mí, gracias por brindarme ese amor incondicional que los caracteriza, los amo.

A mi pareja por entenderme y apoyarme incondicionalmente, te agradezco toda tu ayuda y aporte durante mi formación profesional, gracias por existir.

Quiero agradecer a cada uno de los docentes de este posgrado por compartir sin límite sus conocimientos a lo largo de mi preparación y un agradecimiento especial a mis directores de tesis, a la Dra. Ana Gabriela Carrillo, Dr. Miguel Ángel Cadena, Dra. Eva Viviana Sarmiento y al Dr. Edgar Méndez por todo su apoyo y atención durante la elaboración de esta tesis de investigación.

A CONACYT por la beca otorgada 928280.

Me van a faltar páginas para agradecer a cada una de las personas involucradas en esta meta de la vida, espero poder retribuirlo a cada uno de ellos de alguna u otra forma.

Contenido

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
Hueso y tejido óseo.....	11
Historia.....	17
Materiales de sustitución ósea.....	20
Autoinjerto.....	20
Aloinjerto.....	21
Xenoinjerto.....	21
Andamios Poliméricos.....	22
Cerámicas.....	24
Compositos.....	25
Características generales y propiedades del grafeno	30
Aplicaciones Biomédicas del Grafeno.....	31
Andamios para órganos de bioingeniería.....	32
JUSTIFICACIÓN	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
HIPÓTESIS	36
Hipótesis de trabajo	36
Hipótesis nula	36

Hipótesis alternativa.....	36
OBJETIVOS	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos	37
VARIABLES	38
Variables independientes.....	38
Variables dependientes.....	38
OPERACIÓN DE VARIABLES	39
MATERIALES Y MÉTODOS	40
Tipo de estudio.....	40
Universo de estudio.....	40
Reactivos químicos	40
Equipo.....	40
Animales	41
Procedimiento quirúrgico	41
Sacrificio de los animales en experimentación y obtención de biopsias	43
Análisis histológico de las muestras obtenidas	43
Inmuno histoquímica	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
RESULTADOS.....	49
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES.....	67
RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Imagen de un corte sagital de tibia. Tomado de revista de artroscopia.
 12

FIGURA 2 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 y capa osteogénica .Imagen tomada de aula virtual de anatomía. 13

FIGURA 3. Mediadores celulares en la formación de tejido óseo. Figura tomada de: Principios de anatomía y fisiología. 14

FIGURA 4 Representación esquemática del proceso de formación de tejido óseo. Figura tomada de: Principios de anatomía y fisiología. 14

FIGURA 5 Proceso de remodelación del hueso. Imagen tomada de E. Michael Lewiecki, 2011..... 16

FIGURA 6 Grafeno es la unidad básica elemental en 2D para construir todos los materiales gráfiticos de las demás dimensiones. Fullerenos, nanotubos, grafito tridimensional. Imagen tomada de la revista fundación para el conocimiento Madrid.
 26

FIGURA 7. Aplicaciones biomédicas del grafeno. Imagen tomada de; Geetha Bai, R. Et al., Graphene: A versatile platform for nanotheranostics and tissue engineering Progress in Materials Science, 2018. 27

FIGURA 8. Esquema de la obtención y estructura de las diferentes formas del grafeno a partir de grafito; óxido de grafeno; rGo: óxido de grafeno reducido; CVD: chemical vapor deposition (por sus siglas en inglés). . Imagen tomada de; Geetha Bai, R. Et al., Graphene: A versatile platform for nanotheranostics and tissue engineering Progress in Materials Science, 2018 28

FIGURA 9.Espectro Raman de pristine grafeno (espectro superior) y sus derivados: Óxido de grafeno (GrO) y Óxido de grafeno reducido (rGrO) (espectro inferior). Imagen tomada de la revista American Physical Society. 30

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 10 Representación esquemática de la metodología para aplicación del injerto en el modelo animal.....	42
FIGURA 11 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO. A) rata rasurada para su cirugía. B) Incisión de 2 cm. C) Separación del colgajo y periostio. D) Trepanación de del cráneo de 4 mm en ambos parietales.	42
FIGURA 12 Porcentaje del tipo de inflamación (inflamación crónica, aguda, mixta, ausente) tinción con hematoxicilina y eosina, muestras a los 4, 16, 45, 60 días...	57
FIGURA 13 Porcentaje del grado de inflamación (severa, moderado, leve, mínimo) tinción con hematoxicilina y eosina, muestras a los 4, 16, 45, 60 días.....	59
FIGURA 14. Recuento de las células del linaje inmunológico. Células observadas (Tinción con hematoxilina y eosina) en las muestras de tejido óseo procesadas a los 4,16, 45, 60, (NO= neutrófilo, LO=linfocitos MO=macrófagos, CGM= células gigantes multinucleadas, H= hemorragia.)	61
TABLA 1. Protocolo del procesamiento en parafina de las muestras de tejido óseo en el proceso de tejido modelo so-120.....	45
TABLA 3. Claves de los cada uno de las ratas de experimentación, según el material y los días del análisis.	49
TABLA 4. Resumen de los indicadores relacionados al proceso inflamatorio observadas en la muestras de tejidos óseos teñidas con hematoxilina y eosina. .	54
Imagen 1 Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R3-4-GO. A) Se observa la base del hueso en donde se hizo el defecto, no es hueso neoformado) 20x. B) Se observan múltiples células inflamatorias Imagen 40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.50	
Imagen 2 Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R4-4-C A) se observa en el centro el defecto, a la izquierda se observa la base del hueso.20X B) se observa una inflamación aguda, con tejido fibroso, fibrina, neutrófilos 40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

- Imagen 3.** Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R1-16-GOCa A) Se observa el hueso normal a los lados y en el centro el defecto y predomina la presencia del material. B) se observan células inflamatorias y fibrina. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina..... 51
- Imagen 4.** Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R4-16-GO. A) Se observa el defecto a la izquierda y a la derecha el hueso normal.20X B) Se observan múltiples células inflamatorias.40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina. 51
- Imagen 5.** Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R4-16-C. A) Se observa el centro del defecto 20X. B) Se observan células inflamatorias y múltiples osteoblastos 40X .C) acercamiento en donde se observa osteoblastos 40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina..... 52
- Imagen 6.** Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R2-45-GOCa. A) Vista panorámica del corte longitudinal. B) Se observa la presencia del material y alrededor de él células inflamatorias y osteoblastos.40X C) acercamiento a la presencia de osteoblastos y tejido osteoide.100 X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina..... 52
- Imagen 7.** Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R2-45-C. A) Se observa corte longitudinal del defecto. B) Se observa fibrina por arriba, células inflamatorias, no se observa formación de hueso 40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina..... 53
- Imagen 8.** Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R2-45-GO. A) Vista panorámica del corte, se observa el hueso normal a los lados (el corte se cerró al momento del procesamiento de las muestras) B) se observa bastante tejido fibroso alrededor del material. 40X C) magnificación de la muestra.100X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina..... 53
- Imagen 9.** Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R4-60-GO. A) Se observa corte longitudinal de la muestra con la presencia de bastante material 20X. B) magnificación de la muestra donde se ve el material fragmentado, signo de que el material si ha sido reabsorbido 40X 54

LISTA DE ABREVIATURAS

MEC	Matriz extracelular
BMU's	Unidades básicas multicelulares
ARF	Activación reabsorción- formación
OPG	Osteoprotegerin
PLLA	Ácido poli-L-láctico
PLGA	Ácido poli-L-glicólico
PEG	Polietilenglicol
PLA poli	Poli (ácido láctico)
PGA	Ácido glicólico
PCL	Poli (caprolactona)
HA	Hidroxiapatita
PO	Fosfato
OH	Hidroxilo
CO	Carbonato
Fe	Hierro
Ta	Tántalo
Co	Cobalto
GO	Óxido de grafeno

LISTA DE ABREVIATURAS

rGO	GO reducido
GrOCa	Óxido de grafeno calcio
CVD	Deposición química de vapor
TEC	Transistores de efecto de campo de grafeno
AN	Ácidos nucleicos
hMSC	células madre mesenquimales humanas

RESUMEN

Objetivos: El objetivo de la presente investigación fue realizar un análisis histológico del efecto del uso de Óxido de grafeno (GO) y Óxido de grafeno con Calcio (GOCa) como andamios moleculares para la restauración ósea en defectos óseos creados quirúrgicamente en cráneos de ratas.

Materiales y métodos: Se realizó un defecto óseo en los parietales de 4 mm a 16 ratas adultas, los animales se asignaron al azar a uno de los 4 grupos experimentales: grupo I (4 días), grupo II (16 días), grupo III (45 días), grupo IV (60 días), 4 ratas a cada grupo, las cuales a 2 ratas se le colocó en el defecto derecho óxido de grafeno (GO) y a otras 2 óxido de grafeno con calcio (GrOCa); dejando el defecto izquierdo vacío como grupo control. Posteriormente fueron sacrificados respectivamente al grupo que pertenecían, 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: El grupo con Oxido de grafeno calcio (GOCa) mostro menor grado de inflamación en comparación GO, tambien la movilización celular fue menor en el grupo GOCa con respecto al grupo GO, durante los primeros días, aumentando gradualmente, hasta llegar resultados similares a los 60 días. El GOCa, presentó menor grado de hemorragia al inicio, durante y al final del tiempo de observación en comparación a GO.

Conclusiones: Los resultados obtenidos con la colocación del injerto GO y GOCa no demostraron una curación ósea superior a los grupos controles, sin embargo podemos concluir que el material sirve como andamio para favorecer el tránsito de formación ósea (osteoconductor), ya que se encontró tejido óseo entre el material injertado en el centro del defecto en comparación a los grupos controles que solo se encontraba tejido óseo en la periferia del defecto.

INTRODUCCIÓN

En la odontología existen múltiples especialidades de las cuales la endodoncia es una de ellas, esta es la encargada del estudio de la anatomía de la cavidad pulpar, la fisiología y la patología de la pulpa dental, así como la prevención y eliminación de las alteraciones pulpares y cualquier repercusión que pudiera originarse sobre los tejidos perirradiculares (1,2).

Se tiene que reconocer que el ámbito de la endodoncia es amplio, va desde un simple diagnóstico diferencial hasta tratamientos para eliminar el dolor orofacial de origen pulpar y periapical; en la endodoncia también se incluyen los recubrimientos pulpares directos e indirectos para mantener la vitalidad de la pulpa; los tratamientos de conductos radiculares cuando es inevitable conservar su vitalidad o cuando existe necrosis de la misma, con o sin complicación periapical; la endodoncia tiene un área quirúrgica conocida comúnmente como “cirugía apical” que elimina los tejidos periapicales inflamatorios a consecuencia de alguna patología pulpar (2,3).

Las altas tasas de vulnerabilidad a traumatismos y fracturas óseas han atraído extensas investigaciones en el campo de la regeneración del tejido óseo. El hueso tiene una estructura jerárquica y compleja que soporta sus diversas funciones mecánicas, biológicas y químicas (4,5) .

En décadas recientes se ha aumentado la esperanza de vida la cual está directamente asociada al gran desarrollo de investigación en biomateriales, ya que al haber una mayor esperanza de vida ha provocado el aumento de la incidencia de patologías asociadas a la edad, como lo es la osteoporosis. Debido a esta situación, existe una gran demanda de biomateriales para el reemplazo de tejido óseo que, aunado a la alta tasa actual de fallo de estos implantes a nivel clínico, hace que cobre mayor importancia a esta área de estudio. Estos materiales son utilizados hoy

en día como sustitutos óseos para todo tipo de cirugías desde ortopédicas hasta dentales y maxilofaciales (4,5).

Se han realizado múltiples estudios sobre los procesos de cicatrización ósea y se han desarrollado técnicas para la corrección de defectos óseos, incluido el uso de varios tipos de injertos, membranas y una combinación de ambas técnicas. Se han utilizado muchos sustitutos óseos debido a sus propiedades osteoconductoras y osteoinductoras, y resultados positivos han sido reportados usando xenoinjertos (6).

Cada vez más ha sido realizada por dentistas la restauración con apoyo de implantes 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. Por lo tanto, para minimizar la pérdida de hueso alveolar, o incluso restaurarla, diferentes tipos de injertos aloplásticos se han desarrollado por ingeniería de tejidos (7).

En endodoncia nos enfrentamos con defectos óseos grandes los cuales 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. Diversas 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.

Hueso y tejido óseo

Un hueso está compuesto de una serie de tejidos, principalmente por tejido óseo y otros tejidos conjuntivos, incluidos el tejido hemopoyético y el tejido adiposo, junto con vasos sanguíneos y nervios. El tejido óseo se clasifica en compacto comúnmente llamado denso y el esponjoso llamado también trabeculado. Al

INTRODUCCIÓN

examinar con un corte de un hueso la parte superficial se pueden identificar dos organizaciones estructurales distintas del tejido óseo. Una capa densa y compacta forma la superficie ósea externa que corresponde al 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 llamado tejido óseo esponjoso.

Los espacios que hay en la malla están comunicados y, contienen la médula y vasos sanguíneos(8).

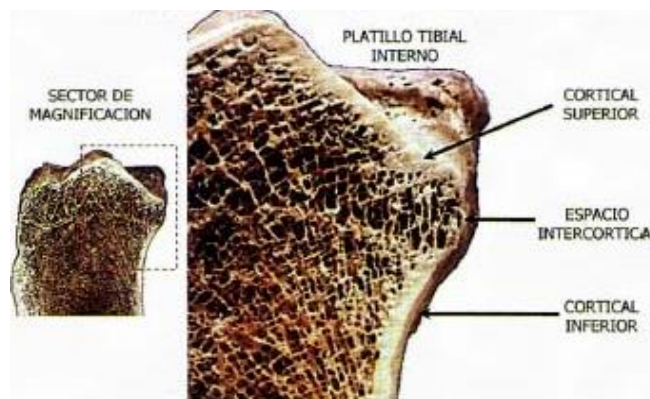


FIGURA 1. Imagen de un corte sagital de tibia. Tomado de revista de artroscopia.

Como se mencionó anteriormente los huesos están formados primordialmente por tejido óseo y estos están acompañados por tejido conectivo propiamente dicho y por tejido cartilaginoso. El tejido conectivo forma el periostio que son membranas que revisten las superficies externas y el endostio que reviste la parte interna de los huesos (figura 2) (8).

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 (8).

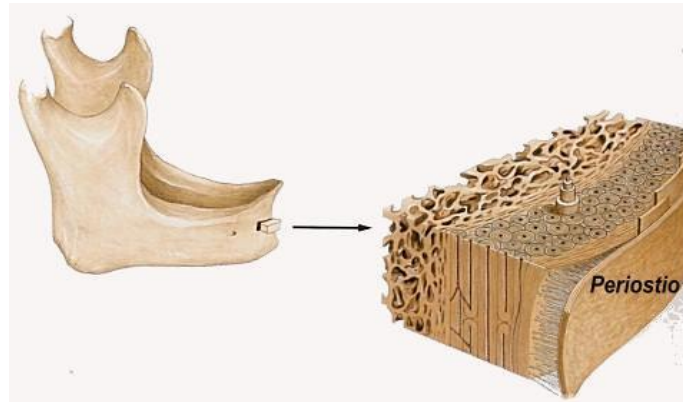


FIGURA 2 Esquema del periostio. El periostio es la membrana que rodea al hueso por cartílago articular. El periostio está compuesto por dos capas: capa exterior fibrosa y capa osteogénica. Imagen tomada de aula virtual de anatomía.

Los osteoblastos son las células especializadas en la formación de tejido óseo, estas son responsables de la síntesis de matriz ósea y del crecimiento y remodelación del hueso.

Los osteoblastos se encuentran alineados uno al lado del otro formando una capa celular de una célula de espesor. Esta matriz extracelular (MEC) recibe el nombre de sustancia osteoide y contiene proteoglicanos, glicoproteínas y abundantes fibras colágenas (Figura 3). Esta matriz ósea, aun no se encuentra mineralizada, la cual va a madurar por deposiciones de sales de calcio; Los osteoblastos depositan sobre las fibras colágenas las sales de hidroxiapatita (fosfato de calcio) que mineralizan el hueso, otorgándole rigidez. En el tejido óseo se encuentra gran parte del calcio y del fosfato del organismo. Cuando las células quedan completamente rodeadas por la matriz extracelular, reciben el nombre de osteocitos. Por la peculiar forma de los osteocitos (aspecto arañeiforme, forma de araña) (Figura 3), distintos osteocitos pueden conectarse entre sí gracias a las prolongaciones (8).

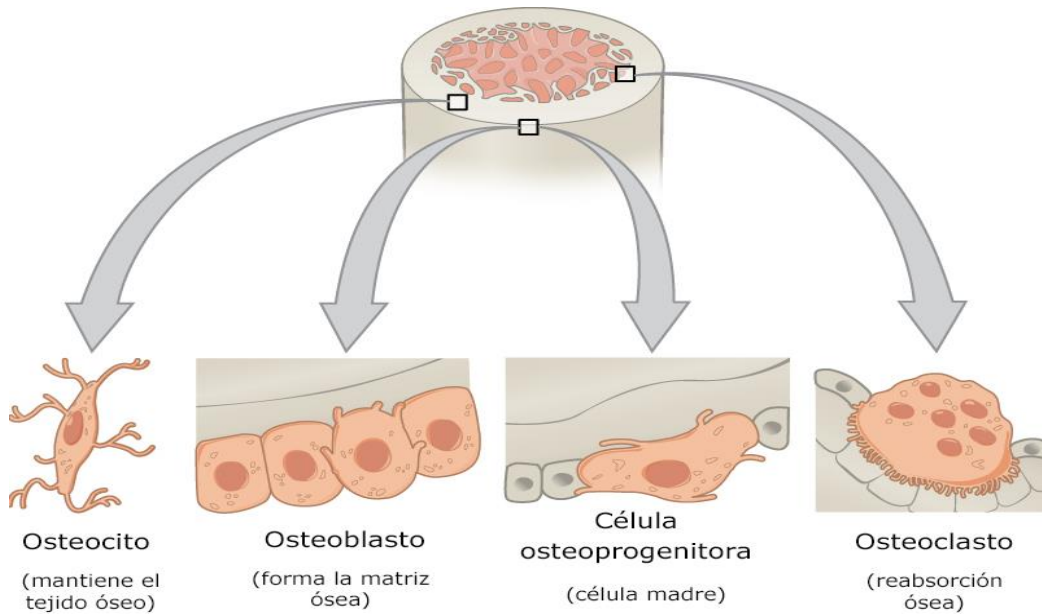


FIGURA 3. Mediadores celulares en la formación de tejido óseo. Figura tomada de: Principios de anatomía y fisiología.

El tejido óseo es muy activo metabólicamente. 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 son del resultado de la acción combinada de los osteoclastos y los osteoblastos (8).

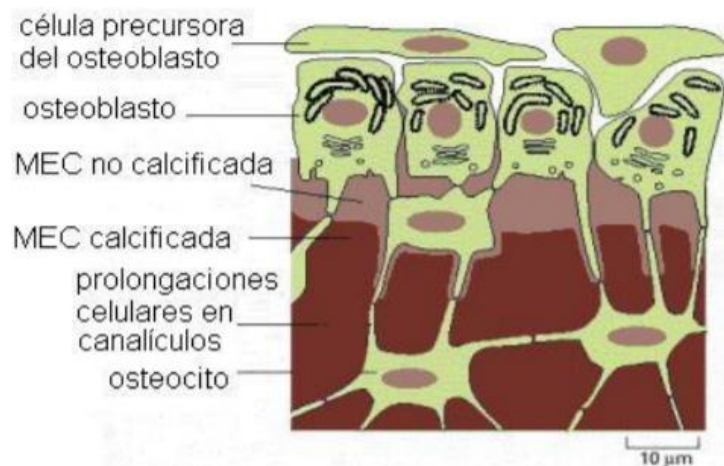


FIGURA 4 Representación esquemática del proceso de formación de tejido óseo. Figura tomada de: Principios de anatomía y fisiología.

Los osteoclastos son células (Figura 3), multinucleadas, formadas por la unión de monocitos provenientes de la médula ósea y con un elevado contenido de enzimas lisosómicas; estas células son de mayor tamaño que los osteoblastos. Los osteoclastos se encuentran sobre las superficies óseas ya sea de manera aislada o en grupos poco numerosos y cuando un hueso va a ser remodelado (Figura 4), los osteoclastos liberan minerales, resultando en una transferencia de ion calcio desde la matriz ósea a la sangre así eliminando hueso, este proceso se denomina resorción ósea. El crecimiento de los huesos va a requerir el trabajo de ambas células mencionadas; cuando se realice la resorción de algunas partes será a cargo de los osteoclastos, y formación de nueva matriz, por parte de los osteoblastos (8).

Después de una fractura, la periostina expresada en el periostio juega un papel muy importante en la reparación del hueso, repitiendo el proceso embrionario original. La periostina recluta las células osteoprogenitoras dentro del callo óseo y en los estadios tempranos de la diferenciación de osteoblastos y formación ósea. Las células cartilaginosas se van a diferenciar a partir del periostio. Posteriormente el cartílago se reemplaza por el trabajo conjunto de osteoclastos y osteoblastos (8).

Las BMU's (Unidades básicas multicelulares) son la unidad estructural y funcional del tejido óseo, estas unidades contienen los elementos necesarios para el 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 que como se dijo anteriormente estas sirven para remodelar el hueso y luego osteoblastos para producir nuevo hueso, este proceso es un estereotipo de activación seguido por la reabsorción y finalizando con la formación (ARF). Las micro fracturas van a dar el inicio del proceso de apoptosis en algunas células óseas, principalmente osteocitos, que liberan prostaglandinas y citoquinas para que de como resultado la remodelación ósea. Finalizado este proceso, empieza a actuar la cascada de la coagulación y la cicatrización disminuyendo la actividad osteoclastica esto sucede

debido a que los osteoblastos que están conectados con los osteocitos por medio de uniones celulares crean una adhesión de moléculas de esta manera se impiden la llegada de los osteoclastos al sitio quirúrgico, y también porque las citoquinas producen el RANKL ligando receptor activador para el factor nuclear kB , y como el preosteoclasto en sangre tiene los 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 5). 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) (8).

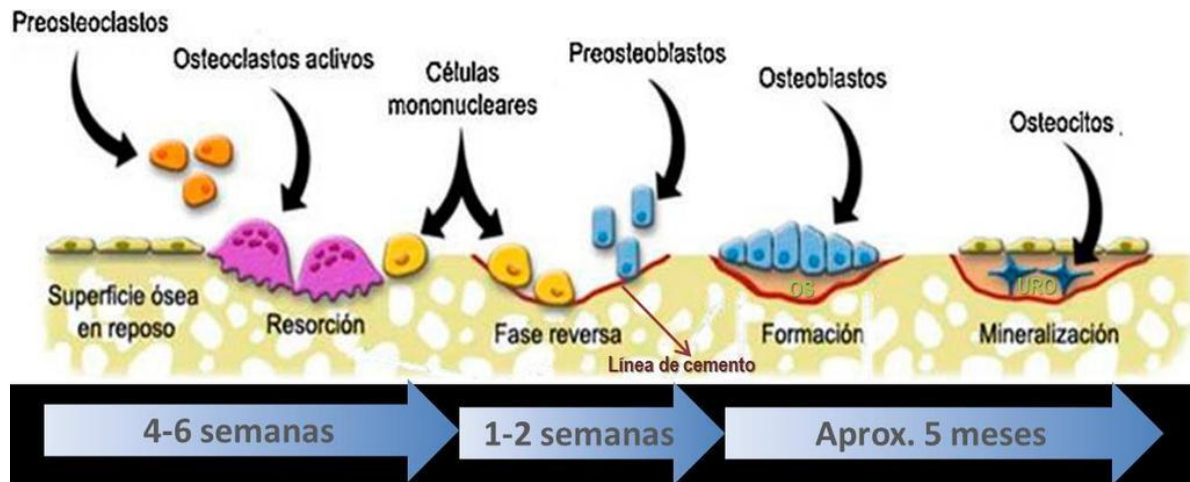


FIGURA 5 Proceso de remodelación del hueso. Imagen tomada de E. Michael Lewiecki, 2011

Ingeniería de tejidos

El término "ingeniería de tejidos" se definió en un taller de la National Science Foundation como "la aplicación de los principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructura-función en tejidos de mamíferos normales y patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función del tejido" (9,10).

En otras palabras 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 (11,12).

Historia

Un cirujano ortopédico pediátrico en el Hospital de Niños, W. T. Green, M.D., realizó una serie de experimentos a principios de la década de 1970 para generar cartílago nuevo usando condrocitos sembrados en espículas de hueso e implantados en ratones desnudos. Aunque no tuvo éxito, concluyó correctamente que con el advenimiento de materiales biocompatibles innovadores sería posible generar nuevo tejido sembrando de células viables en andamios configurados adecuadamente. Varios años después, los Dres. Burke y Yannas del Hospital General de Massachusetts y M.I.T. colaboró en estudios tanto en el laboratorio como en humanos para generar un sustituto de la piel diseñado por tejidos utilizando una matriz de colágeno para apoyar el crecimiento de fibroblastos dérmicos (13,14).

Entre las primeras construcciones de piel de ingeniería de tejidos donde el producto desarrollado por el Dr. Howard Green y sus colegas en Harvard Medical School, que describieron técnicas para hacer crecer la epidermis, comenzando con una biopsia de piel extraída de un paciente, transfiriendo láminas de queratinocitos a pacientes quemados. Mientras que el Dr. Eugene Bell sembró geles de colágeno

con fibroblastos, refiriéndose a ellos como geles de colágeno contraídos. Todos estos ejemplos representan semillas de la nueva disciplina ahora conocida como Ingeniería de tejidos (12–15) .

Andamios en ingeniería de tejidos

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 (18–20) .

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, su arquitectura y composición deben favorecer las uniones celulares, la proliferación y diferenciación de las células hospedadoras circundantes al área lesionada (18–21).

Por lo tanto los andamios celulares generalmente sirven al menos para uno de los siguientes propósitos (22):

1. Unión celular y quizás migración.
2. Retención y presentación de factores bioquímicos.
3. Crear un medio ambiente poroso para una difusión adecuada de nutrientes, productos expresados y desechos.
4. Rigidez mecánica o flexibilidad.

Ingeniería de tejidos en tejido duro

En los últimos años, una nueva era en cirugía reconstructiva ha comenzado con la aplicación de ingeniería de tejidos, incluido el uso de células, andamios y factores de crecimiento para mejorar la curación y regeneración ósea (23).

Al diseñar una construcción ósea con estos 3 elementos, puede ser posible la creación de un material ideal, que sea fácilmente disponible y altamente confiable de injerto óseo sin la necesidad de morbilidad del sitio donante y con un bajo riesgo de infección o antigenicidad (23).

Podrían conservarse las señales osteogénicas u osteoinductoras, la construcción podría manipularse fácilmente pero permaneciendo estables y se puede mantener el suministro vascular (23).

Al evaluar un defecto craneofacial complejo, un andamio 3D que puede resistir las presiones del tejido blando suprayacente son necesarias para reconstruir el tejido duro que falta. Estos andamios deben mantener espacio o el espacio perdido para permitir la regeneración de tejidos; al igual que proporcionar un entorno para unión celular y posiblemente proliferación, diferenciación, o ambas; y soportar la carga funcional que soporta el crecimiento óseo. Este andamio debe ser degradado, metabolizado o excretado fácilmente, y ser rentable cuando se procesa para adaptarse a los defectos complejos. El andamio también debe proporcionar una interfaz con los receptores celulares y matriz extracelulares para facilitar la interacción funcional que permite que ocurran funciones celulares normales. Hasta la fecha, ácido poli-L-láctico (PLLA) y El ácido poli-L-glicólico (PLGA) son andamios sintéticos de uso común en ingeniería de tejidos óseos porque son biológicamente inertes y seguros de usar en humanos. Los estudios in vivo en animales han demostrado que la capacidad de estos andamios para regenerar hueso en defectos de tamaño crítico o no crítico cuando se incorporan con factores recombinantes de crecimiento. Muchos otros andamios sintéticos y naturales se han utilizado con éxito para la reparación y regeneración

ósea, incluyendo PLGA / polietilenglicol (PEG), fosfato de calcio, colágeno, alginato, seda, policaprolactona, poli (fumarato de propileno), y otros (23).

Además del uso de andamios sintéticos o naturales, se pueden alterar sus propiedades superficiales, incluida la textura, rugosidad, hidrofobicidad, carga y composición química, para mejorar la interacción con las células para mejorar la señalización, la diferenciación y la función celular (23).

Materiales de sustitución ósea

Un sustituto óseo ideal debe de cumplir con cuatro requisitos indispensables:

- Osteoconducción: esta es la capacidad del biomaterial de apoyar el crecimiento óseo en su superficie, en otras palabras sirve como un andamio para el crecimiento de hueso nuevo que se perpetúa por el hueso nativo (24,25).
- Osteointegración: esta es la capacidad del sustituto de unirse químicamente al hueso sin que se forme una capa intermedia de tejido fibroso y logre ser un mismo ente (24,25) .
- Osteoinducción: es la capacidad de inducir la diferenciación de células madre adultas no diferenciadas hacia osteoblastos (24,25) .
- Osteogénesis: esta es la formación de nuevo hueso por parte de osteoblastos presentes en la matriz del biomaterial (24,25) .

Dependiendo del origen podemos clasificar los injertos óseos como: autoinjerto, aloinjerto, xenoinjerto y los sustitutos óseos sintéticos (26).

Autoinjerto

A este se le considera el sustituto óseo estándar, cumple con todos los requisitos mencionados. Este es un tejido u órgano que será separado de su origen y luego es colocado en otro lugar (lugar del defecto) del mismo organismo. El componente celular de los injertos autógenos de hueso esponjoso consta de las células que sobreviven al trasplante, pocos osteoblastos maduros y un número más alto de

células precursoras (25,27). El potencial osteogénico del injerto óseo autógeno se deriva de estas células precursoras. Sin embargo, este sufre las siguientes limitaciones: aumenta el tiempo del procedimiento quirúrgico, hay limitaciones en la cantidad y la forma del injerto, este aumenta el riesgo de la morbilidad relacionada con la pérdida de sangre, puede existir complicaciones de la reparación del sitio quirúrgico, posible pérdida sensorial local y dolor crónico (28). En estudios se han demostrado que el dolor en el área donante duró más de tres meses en hasta 15% de los pacientes donde la fuente del injerto óseo fue la cresta iliaca; esto puede relacionarse con la extensión de la disección necesaria para obtener el injerto (26,28).

Aloinjerto

Este es el trasplante de un tejido u órgano de diferentes individuos pero de la misma especie. Estos son una alternativa a los autoinjertos, cumplen con las propiedades de osteointegración, osteoconducción y osteoinducción pero no cumplen con la propiedad de osteogénesis debido a la carencia de células vivas. La actividad osteoinductora del aloinjerto es limitada a su uso en forma desmineralizada o granulada. La gran ventaja de los aloinjertos es que proporcionan un sustituto óseo sin limitaciones de cantidad y no hay riesgo de morbilidad. El uso de los aloinjertos está muy indicado para tratar defectos óseos grandes que requieren soporte estructural y cuando la cantidad del autoinjerto es insuficiente. Algunas de las complicaciones que existen con los aloinjertos es el riesgo de fractura (alrededor del 19%), el fracaso en lograr la unión con el huésped y la infección. Existe un mayor riesgo de infección bacteriana cuando se emplean cantidades masivas de aloinjerto (26,29).

Xenoinjerto

El xenoinjerto es el sustituto óseo proveniente de una especie diferente del receptor. Como por ejemplo los más comunes utilizados en esta forma son el hueso bovino desengrasado y desnaturalizado o el colágeno de origen bovino en diferentes

presentaciones (polvo, esponja, malla y fieltro). Los sustitos óseos artificiales cumplen con las propiedades de osteointegración y osteoconducción. El Bio-oss (Geistlich Biomaterials) es posiblemente el biomaterial más estudiado como sustituto óseo en los últimos años. El Bio-oss es un xenoinjerto óseo de origen bovino que presenta una área superficial interna de 79,7 m² /g. Durante su proceso de fabricación se elimina la matriz orgánica sin alterar los microtúneles existentes entre los cristales de apatita, resultando en una matriz mineral remanente con cristales de aproximadamente 100 micras de diámetro que presenta propiedades químicas, morfológicas y ultraestructurales muy similares al hueso humano (26,30).

Tipos de andamios

Diversos materiales sintéticos y naturales, biodegradables y no biodegradables han sido utilizados en la fabricación de andamios óseos obtenidos a través de diferentes metodologías (31). Los materiales sintéticos tienen diversas ventajas sobre los materiales naturales en términos de mayor fuerza mecánica, biocompatibilidad, degradabilidad, efectividad y costos (32–34). Ejemplos de ellos son las cerámicas, los polímeros y los compositos (35).

Andamios Poliméricos

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 (36–39). Son biocompatibles, biodegradables, y se pueden sintetizar fácilmente en diferentes formas. Otro ejemplos incluyen el poli (metacrilato de metilo), el poli (e-vcbxli sulfona) (40,41).

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) (42–44).

Se ha reportado que los andamios basados en matriz extracelular (MEC) tienen muchas similitudes al tejido original (44–46). 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). A diferencia de los andamios autógenos basados en MEC, 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 (47–49) .

La disponibilidad es el principal problema con los andamios basados en MEC alógenos. Si bien los andamios xenógenos son abundantes, están limitados debido a la transferencia o mutación de ADN (50,51). 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 (52,53). 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 (31).

Cerámicas

El tejido óseo está constituido aproximadamente un 70% de hidroxiapatita (HA) y 30% de colágeno (54). 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 (55). 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 ya que es biocompatible, osteoconductor, similar a las porciones inorgánicas del tejido óseo y dental. Además, es mecánicamente resistente y bioactivo, no es antigénico, carcinogénico ni tóxico (56,57).

Sin embargo, la HA que se ha utilizado clínicamente no es biodegradable y permanece en el sitio de implantación durante largos periodos, lo que limita la regeneración ósea. La falta de degradación se debe probablemente a las altas temperaturas durante la producción de cerámica y al tratamiento después de la síntesis que aumenta la cristalinidad y dificulta la biosorción (58,59). Es por esto, que los materiales nano-estructurados con baja cristalinidad se muestran como alternativas potenciales a los injertos cuando son producidas con materiales no sinterizados a baja temperaturas y pueden así, imitar a la apatita biológica (60,61). Se han reportado modificaciones químicas exitosas de la HA mediante la sustitución de grupos fosfato (PO) y/o hidroxilo (OH) con carbonato (CO) con la finalidad de disminuir la cristalinidad y aumentar la solubilidad, que favorezca una rápida bioabsorción y regeneración ósea (62).

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}) (63).

Compositos

Los andamios contruidos de dos o más materiales diferentes (Compositos), tienen la capacidad de combinar las ventajas de los materiales que son constituidos (materiales metálicos, cerámicos y polímeros) y mejorar así las biopropiedades andamio y de degradación (64). Algunos ejemplos de estos, son los compuestos de polímero/cerámica que demuestran excelentes propiedades mecánicas y osteoconductividad (65,66). 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, 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 (67–71).

Múltiples trabajos han revelado que para mejorar la biocompatibilidad en aplicaciones ortopédicas es necesario recubrir los vidrios, metales, cerámicas inorgánicas y polímeros orgánicos (como PLGA, PS, PP y silicona), colágenos y fibras de seda utilizando fosfato de calcio, (72). En otros estudios 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 (73).

Las aleaciones de Fe han mostrado una degradación in vitro más rápida en comparación con la forma pura (74,75). 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. 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. 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 (76–82).

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 ya antes mencionadas es crucial para la eficiencia del proceso de regeneración de tejidos. Un material funcional que posee tales características es el grafeno, hoy en día conocemos al grafeno para ser utilizado en ingeniería de tejidos el cual se define como una fina lámina plana de átomos de carbono con hibridación sp^2 en dos dimensiones (2D), formando una estructura similar a un panel de abeja. El grafeno es el nombre dado a una sola capa de átomos de carbono empaquetado densamente en una estructura de anillo de benceno, y se usa ampliamente para describir las propiedades de muchos materiales basados en carbono, incluyendo grafito, fulerenos grandes, nanotubos, entre otros (Figura 6) (83–85).

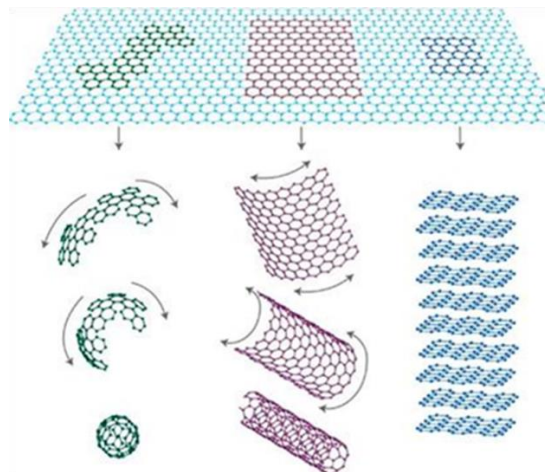


FIGURA 6 Grafeno es la unidad básica elemental en 2D para construir todos los materiales gráficos de las demás dimensiones. Fulerenos, nanotubos, grafito tridimensional. Imagen tomada de la revista fundación para el conocimiento Madrid.

El grafeno es una de las formas alotrópicas del carbono, como lo son también el grafito y el diamante (86,87). Su conductividad eléctrica y la movilidad de carga superan a los polímeros más conductores por varias órdenes de magnitud (88) 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 7) (biosensores, nanotransportadores para la administración de fármacos y genes, dispositivos para imágenes de células y fototerapia para el cáncer, etc.) (88–92).

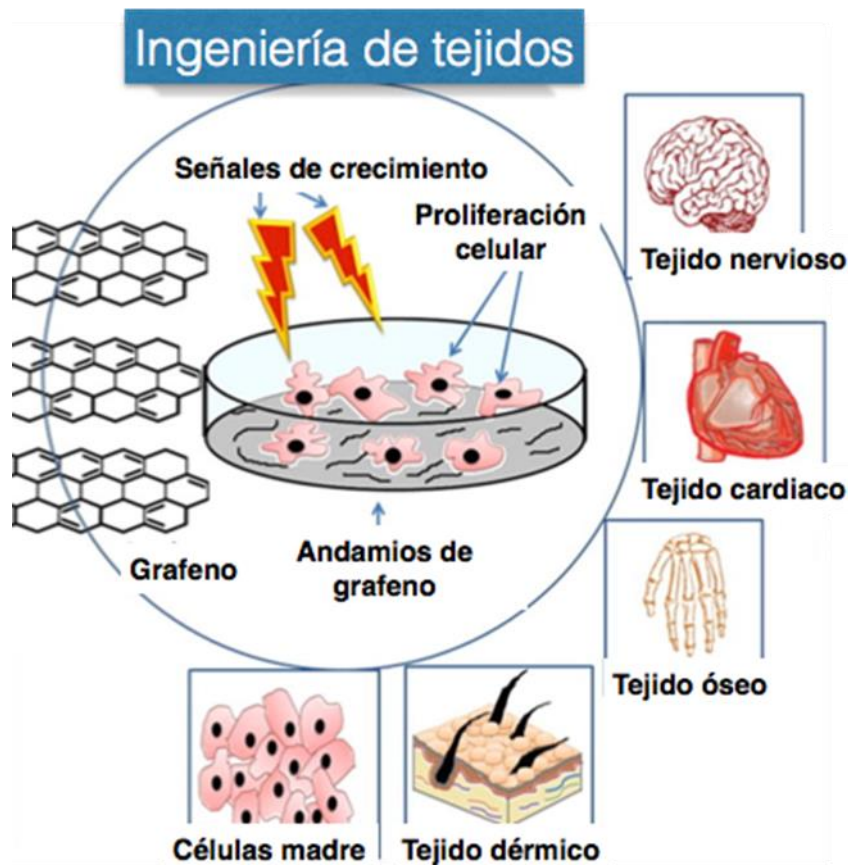


FIGURA 7. Aplicaciones biomédicas del grafeno. Imagen tomada de; Geetha Bai, R. Et al., Graphene: A versatile platform for nanotheranostics and tissue engineering Progress in Materials Science, 2018.

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 8). 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 (12,48,88,91).

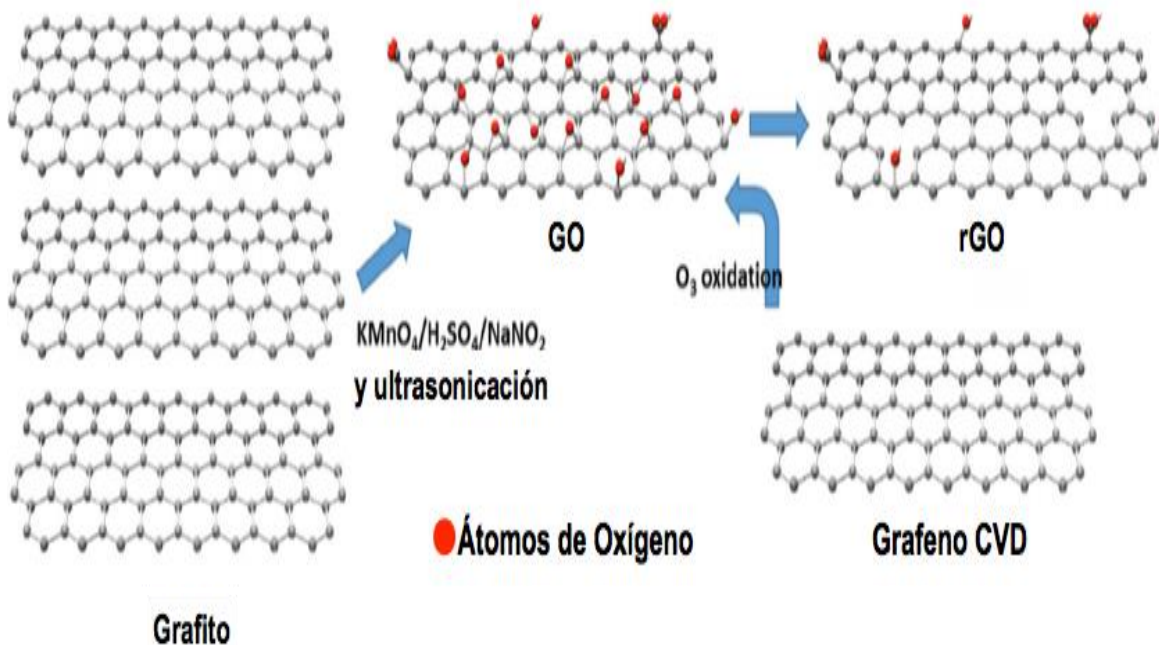


FIGURA 8. Esquema de la obtención y estructura de las diferentes formas del grafeno a partir de grafito; óxido de grafeno; rGo: óxido de grafeno reducido; CVD: chemical vapor deposition (por sus siglas en inglés). . Imagen tomada de; Geetha Bai, R. Et al., Graphene: A versatile platform for nanotheranostics and tissue engineering Progress in Materials Science, 2018

Por otro lado, 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 (47,88). 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 (85).

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 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 (93).

Otros métodos para la obtención de grafeno incluyen el crecimiento epitaxial y la deposición química de vapor (CVD). La deposición química de vapor es un versátil y escalable método para la producción a gran escala y alta calidad del grafeno que puede transferirse a diversos sustratos (72).

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 las células cultivadas para promover la proliferación celular y mejorar sus funciones. Los diversos métodos para producir grafeno dan como resultado materiales con diferente número de capas y/o grupos químicos (94–97).

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 11). 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 gráficos mientras que la banda D ($\sim 1340 \text{ cm}^{-1}$) solo se activa si hay trastorno o defectos

presentes. La banda 2D (2500-2800 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 (98).

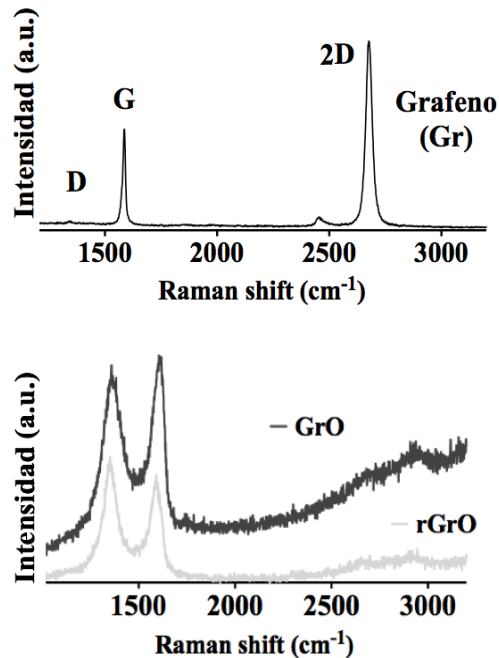


FIGURA 9. Espectro Raman de pristine grafeno (espectro superior) y sus derivados: Óxido de grafeno (GrO) y Óxido de grafeno reducido (rGrO) (espectro inferior). Imagen tomada de la revista American Physical Society.

Características generales y propiedades del grafeno

Este es un material que tiene propiedades muy interesantes que lo convierten en un material extremadamente versátil con una infinidad de aplicaciones en numerosos ámbitos y sectores. 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 (99).

- El grafeno puede ser clasificado en tres tipos: monocapa, bicapa y en rangos de – 10 capas. Al poder obtenerse capas con un átomo de espesor (monocapas), esto hace que no tenga defectos estructurales haciendo que sea más resistente que otros materiales.

- Se le considera un material impermeable. Este permite el paso del agua pero a la vez es totalmente impermeable, que no deja pasar ninguna sustancia, como por ejemplo el helio, debido a su gran densidad y que tiene unos poros nanométricos.
- Tiene una gran conductividad térmica.
- Tiene una dureza excepcional, se han realizado experimentos mediante un microscopio de fuerza atómica para comprobar su resistencia mecánica, llegando a la conclusión de que tiene una resistencia a la rotura mucho mayor que la de los aceros (200 veces mayor).
- Es muy flexible, debido a que presenta defectos en su red, pudiendo estirarse éste mucho más que otros metales, en torno al 10% de su tamaño normal sin que pierda su forma inicial. Con estos mismos experimentos se obtuvo el módulo de Young cuyo valor es 0.5 TPa, más del doble que el de los aceros, pero es menor que el del diamante, por el cual hace que estas propiedades mecánicas sea un material de especial interés en el campo de la nanotecnología ya que pueden soportar presiones elevadas sin sufrir una gran deformación.
- Es muy ligero; una lámina de un metro cuadrado pesa tan sólo 0'77 mg. Se estima que pesa doscientas veces menos que el acero (con la misma superficie) (99,100) .

Aplicaciones Biomédicas del Grafeno

Dai y cols. Fueron los primeros en estudiar las aplicaciones biomédicas del grafeno mediante el uso de óxido de grafeno como vehículo farmacológico para eliminar las células cancerosas de forma selectiva. Seguido de este estudio, se ha creado un gran interés de investigación para usar el grafeno en muchas diferentes aplicaciones, como la exploración de nanomateriales basados en grafeno para aplicaciones de ingeniería de tejidos, imágenes moleculares y administración de fármacos / genes. Existen muchas interacciones biológicas, como la captación

Celular y la citotoxicidad, que dependen en gran medida del tamaño de los nanomateriales. Además de esto, la forma y la superficie de estos nanomateriales también contribuyen a sus aplicaciones biomédicas específicas (84,101).

Andamios para órganos de bioingeniería

La ingeniería de tejidos es un área de investigación muy desafiante y altamente deseable para mejorar el bienestar de la humanidad. Muchos andamios tridimensionales para órganos de bioingeniería han sido estudiados por su idoneidad para el crecimiento de tejidos, por ejemplo, nanomateriales de carbono (nanotubos, nano-diamante y fullereno). La biocompatibilidad es un tema muy importante para un material que se utilizará en aplicaciones biomédicas, ya que inicia el cultivo celular. En los implantes metálicos utilizados comercialmente, sus módulos elásticos son muchas veces más altos que los tejidos; Esto hace que el hueso no se cargue lo suficiente y, finalmente, puede dificultar el crecimiento (84,101).

Por la característica natural de la superficie plana de grafeno, además de las muchas otras propiedades mecánicas, también se puede aprovechar para aplicaciones como el refuerzo estructural de películas biocompatibles y andamios para órganos de bioingeniería. Con respecto a sus estudios de cultivo celular, se ha logrado una mejora del potencial osteogénico utilizando superficies recubiertas de grafeno para la diferenciación de células madre mesenquimales humanas (hMSC) y preosteoblastos en osteoblastos. Los estudios de cultivo celular de láminas de óxido de grafeno también son prometedores como el material de implante adecuado. Aunque se han realizado estudios sobre el grafeno para la ingeniería de tejidos, faltan estudios sobre problemas de impacto en la salud, así como el mecanismo de interacción real de estos materiales con diferentes células. Para abordar estos, los estudios deben estar más enfocados y se deben optimizar las diferentes aplicaciones biomédicas (84,101).

JUSTIFICACIÓN

Los defectos en el hueso alveolar es una de las principales complicaciones post-intervencionales en el tratamiento de lesiones traumáticas, enfermedades periodontales y/o condiciones o patologías relacionadas. La pérdida permanente de los dientes ocasiona en los maxilares una atrofia progresiva que en los casos más avanzados puede dificultar notablemente la inserción de los implantes y posterior rehabilitación protodóncica. En los casos más severos es necesaria la realización de técnicas quirúrgicas avanzadas que eviten las estructuras nobles maxilares como son el seno maxilar y el nervio dentario inferior.

En la mandíbula, el aumento de las áreas atróficas a menudo supone un prerrequisito para obtener el volumen idóneo de hueso para la colocación de implantes en una posición guiada protésicamente y así lograr estabilidad a largo plazo, función y buenos resultados estéticos. Así, la rehabilitación mandibular supone un reto constante debido a la reducción de la altura disponible para la colocación de implantes dentales.

Una altura de hueso insuficiente obligará a buscar diversas alternativas como la realización de injertos óseos, el empleo de implantes, procedimientos de distracción osteogénica, y/o la regeneración ósea guiada.

Específicamente en la especialidad de endodoncia los tratamientos de cirugía apical que consiste en realizar una ventana ósea (en muchas ocasiones esa ventana ósea es inexistente por la gravedad de la lesión) para realizar el corte de 3 milímetros apicales de la raíz son mayormente común en el sector anterior de la boca y la necesidad de colocar un injerto óseo es mayor, por la importancia estética de este sector, lo cual eleva el valor monetario del tratamiento por lo cual en ocasiones no se utilizan.

Las terapias actuales para la regeneración ósea consisten en autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto. El hueso autólogo se considera el material de injerto óseo "estándar de oro", con las capacidades de osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis, sin inmunogenicidad. La utilización del autoinjerto está limitado por el riesgo de infección del donante y el largo tiempo de recuperación. El aloinjerto, obtenido de otro individuo, a menudo se considera la siguiente mejor opción. Pero su uso presenta riesgos potenciales, como un riesgo dramáticamente mayor de infección y rechazo inmunes. Los materiales de xenoinjerto, como la matriz ósea desmineralizada digerida con ácido y el colágeno bovino, se obtienen y fabrican fácilmente, sin embargo tiene débiles capacidades osteoinductoras y su elevado costo implica elevar el valor monetario del tratamiento endodóntico (cirugía apical), por lo que su utilización en la práctica clínica es limitado.

Con la finalidad de aliviar la demanda derivada de la escasez de materiales de autoinjerto y aloinjerto adecuados para aumentar la cicatrización ósea, la ingeniería de tejidos ha desarrollado una variedad de métodos para la regeneración de hueso que incluyen andamios, recubrimientos y membranas de barrera que permiten la regeneración ósea guiada y aumentar el volumen óseo en las áreas de defectos.

En años recientes el grafeno ha captado la atención como un material para mejorar la regeneración ósea. 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 monocapa 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.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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.

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 de dos derivados de grafeno, óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno calcio (GOCa), como andamios celulares para la restauración ósea en un modelo animal.

HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

Los derivados de grafeno, óxido de grafeno y óxido de grafeno con calcio injertado sobre defectos óseos inducidos en ratones tienen la capacidad de promover el crecimiento y reconstrucción del hueso en un tiempo menor al grupo control.

Hipótesis nula

Los derivados de grafeno, óxido de grafeno y óxido de grafeno con calcio injertados sobre defectos óseos inducidos en ratones, promueven el crecimiento y reconstrucción del hueso en los grupos de ratones utilizados, en un tiempo igual que el grupo control.

Hipótesis alternativa

Los derivados de grafeno, óxido de grafeno y óxido de grafeno con calcio injertado sobre defectos óseos inducidos en ratones, tienen la capacidad de promover el crecimiento y reconstrucción del hueso en un tiempo diferente que el grupo control.

OBJETIVOS

Objetivo general

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

Objetivos específicos

Aplicación del injerto, GO y GOCa, en el modelo animal de experimentación posterior a la ejecución del defecto óseo.

Obtener y analizar biopsias de los animales injertados según corresponda al tiempo de análisis.

Interpretar y comparar la eficacia del GO y GOCa sobre materiales descritos en la literatura.

VARIABLES

Variables independientes

1. Óxido Grafeno y óxido de grafeno con calcio.
2. Cantidad de ratas.
3. Tiempo de contacto del material con el hueso de la rata.

Variables dependientes

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

OPERACIÓN DE VARIABLES

A las muestras obtenidas se les realizará un análisis histológico. Para la obtención del análisis histológico las muestras serán tratadas en el procesador de tejidos modelo SP-120 y se realizará la técnica de tinción con hematoxilina y eosina seguido de la observación al microscopio óptico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Experimental in vivo.

Universo de estudio.

Óxido de grafeno y óxido de grafeno con calcio.

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 (estas fueron sintetizados y esterilizados, mediante UV durante 1 hora previo al experimento), Alcohol, ISODINE® SOLUCIÓN.

Equipo

Báscula 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 #8 tallo largo y jeringas de 10, 3 y 1 ml.

Animales

Se utilizaron 16 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 4 grupos experimentales perteneciendo 4 a cada grupo: grupo I (4 días), grupo II (16 días), grupo III (45 días), grupo IV (60 días).

Procedimiento quirúrgico

Los animales fueron anestesiados con hidrocloreto de xilazina y clorhidrato de ketamina, en promedio se utilizaron 3ml. Después del afeitado se procedió a la asepsia y antisepsia sobre el cráneo; posteriormente se realizó una incisión sobre la línea media de aproximadamente 2 cm, se disecaron 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 #8.

Metodología

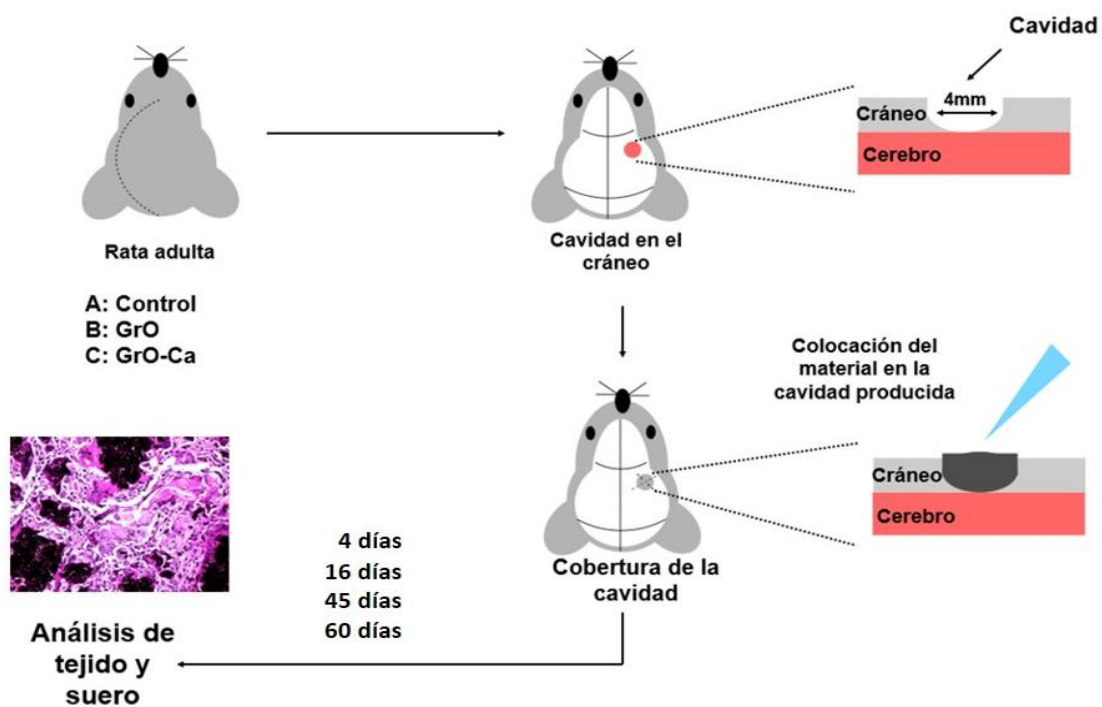


FIGURA 10 Representación esquemática de la metodología para aplicación del injerto en el modelo animal.

El procedimiento se realizó en ambos parietales. Se realizaron 2 defectos en cada animal, en 1 defecto se colocaba el 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.

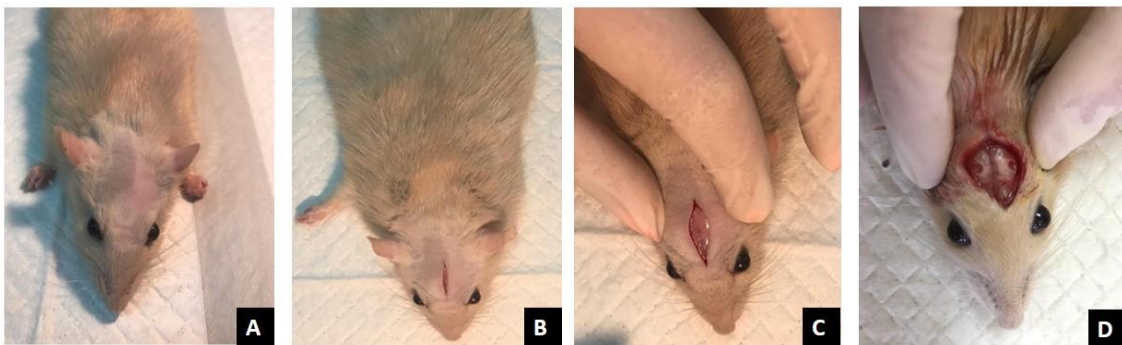


FIGURA 11 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO. A) rata rasurada para su cirugía. B) Incisión de 2 cm. C) Separación del colgajo y periostio. D) Trepanación de del cráneo de 4 mm en ambos parietales.

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) 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 estériles, 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.

Análisis histológico de las muestras obtenidas

Las muestras pasaron por un procesamiento 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

Las muestras se fijaron para su conservación en solución de formaldehído al 10%, en función de su tamaño. Las muestras, una vez fijadas, fueron analizadas macroscópicamente antes de ser pasadas por un proceso de descalcificación. En este paso se realizaron adecuaciones a los tejidos, seleccionando las potenciales áreas representativas para su futura observación al microscopio de luz. Se identificaron las cápsulas con la referencia alfanumérica del frasco que contenía cada una de las muestras, a continuación se procedió al tratamiento de descalcificación, deshidratación, imbibición e inclusión en parafina de los cortes de tejido seleccionados.

Las muestras fueron sometidas a un proceso de descalcificación siguiendo la ruta a continuación:

1. Primera solución (formalina, ácido fórmico 8%, metanol 1%)
 - a. Relación de volúmenes solución-muestra 20:1.
 - b. Tiempo de las muestras en la solución descalcificadora: 24 hrs.
2. Segunda solución (ácido hidrociorhídrico, EDTA y agua)
 - a. Relación de volúmenes solución-muestra 10:1.
 - b. Tiempo de las muestras en la solución descalcificadora: 24 hrs.
3. Lavado con abundante agua y detergente.

A continuación, 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.

Posteriormente se deshidrataron cuidadosamente con alcohol y xilol. El alcohol se eliminó por tratamiento con productos intermedios solubles en alcohol y parafina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso de deshidratación e imbibición en parafina de las muestras se realizó de manera automática con ayuda del procesador centrífugo de tejidos modelo Thermo Scientific™ STP 120 siguiendo la secuencia:

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

				Velocidad de agitación
Vaso N	Reactivo	Tiempo de inmersión horas:minutos	Rpm.	Valor en el programa
1	Formol	01:00	60	1
2	Formol	01:00	60	1
3	Alcohol 60%	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	01:00	70	2
10	Xylol	01:00	60	1
11	parafina	1:00	60	1
12	parafina	1:00	60	1

MATERIALES Y MÉTODOS

Al final del proceso anterior, se procedió a la inclusión de las muestras en bloques de parafina mediante el uso del incluser de tejidos. Una vez configurados los bloques de parafina se esperó a que la parafina solidificará para poder realizar los cortes para el microscopio.

Con un microtomo de rotación manual, tipo Minot, se realizaron cortes de los bloques que contenían las muestras de parafina. Los cortes hechos de las muestras en parafina fueron seriados, con un espesor promedio de 5µm; de la platina de corte se transportaron a la tina de flotación para ser montados sobre portaobjetos, previamente identificados con el código alfanumérico de la cápsula correspondiente.

Cada portaobjetos, ahora con el corte montado, se trasladó a un secador de laminillas, donde la temperatura superaba los 49° C.

Posteriormente fueron sumergidas en xilol para eliminar el exceso de parafina que la exposición al calor no logró retirar. Concluido este proceso se llevaron al tren tinción.

Todas las muestras procesadas fueron teñidas con la tinción de rutina alcohol-ácida de hematoxilina y eosina (HyE). Una vez teñidos los cortes, se colocó resina sobre el tejido para finalmente montar sobre éste un portaobjetos del No. 1.

Concluidos estos pasos, y seca la resina, se procedió a la observación con microscopía de luz con técnica de campo claro, empleando un microscopio óptico triocular modelo Primo Star de la marca Zeiss, objetivos Plan-ACHROMAT de 4x, 10x y 40x.

Inmuno histoquímica

La inmunohistoquímica es un procedimiento que tiene como objetivo detectar, amplificar y hacer visible un antígeno específico, que generalmente es una proteína. Esta técnica permite identificar la localización de una sustancia específica a nivel tisular o celular. Se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar (antígeno primario) (102). En otras palabras la Inmunohistoquímica es toda técnica que permite detectar *in situ* componentes celulares y extracelulares (antígenos) por medio de anticuerpos específicos (de ahí "inmuno"), empleando para ello sistemas de detección enzimáticos (por eso "histoquímica") (103).

La inmunohistoquímica tiene su antecedente en el desarrollo de la inmunofluorescencia. Esta técnica tiene más de 70 años de historia pero su uso en la patología quirúrgica, para el estudio de biopsias, se estableció en 1990.

En la actualidad se ha logrado la automatización del método inmunohistoquímico con anticuerpos mono y/o policlonales de calidad internacional. Esto permite una determinación más segura y estandarizada, en tiempos optimizados, con la consecuente mayor rapidez para la obtención de los resultados. (103).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron procesados utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) y análisis de varianza unidireccional, seguido de una prueba de Bonferroni. $P < 0.05$ se considera que indica una diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Análisis histológico de las muestras obtenidas

Se tomaron muestras de tejido de la zona del defecto con la finalidad de buscar la formación de nuevo tejido y el análisis celular de la zona vecina al aplicación del injerto. Para ello se realizaron cortes histológicos de las muestras tomadas y posterior tinción utilizando Eosina/Hematoxilina. Las claves de las muestras fueron dadas en base al grupo de experimentación, según la tabla 3.

TABLA 2. Claves de los cada uno de las ratas de experimentación, según el material y los días del análisis.

Grupo	No. Rata	Material	Clave
1 (4 días)	Rata 1	Óxido de grafeno calcio	R1-4-GC
		Testigo	R1-4-C
	Rata 2	Óxido de grafeno calcio	R2-4-GC
		Testigo	R2-4-C
	Rata 3	Óxido de grafeno	R3-4-GO
		Testigo	R3-4-C
	Rata 4	Óxido de grafeno	R4-4-GO
		Testigo	R4-4-C
2 (16 días)	Rata 1	Óxido de grafeno calcio	R1-16-GC
		Testigo	R1-16-C
	Rata 2	Óxido de grafeno calcio	R2-16-GC
		Testigo	R2-16-C
	Rata 3	Óxido de grafeno	R3-16-GO
		Testigo	R3-4-C
	Rata 4	Óxido de grafeno	R4-4-GO
		Testigo	R4-4-C
3 (45 días)	Rata 1	Óxido de grafeno calcio	R1-45-GC
		Testigo	R1-45-C
	Rata 2	Óxido de grafeno calcio	R2-45-GC
		Testigo	R2-45-C
	Rata 3	Óxido de grafeno	R3-45-GO
		Testigo	R3-45-C
	Rata 4	Óxido de grafeno	R4-45-GO
		Testigo	R4-45-C

RESULTADOS

4 (60 días)	Rata 1	Óxido de grafeno calcio	R1-60-GC
		Testigo	R1-60-C
	Rata 2	Óxido de grafeno calcio	R2-60-GC
		Testigo	R2-60-C
	Rata 3	Óxido de grafeno	R3-60-GO
		Testigo	R3-60-C
	Rata 4	Óxido de grafeno	R4-60-GO
		Testigo	R4-60-C

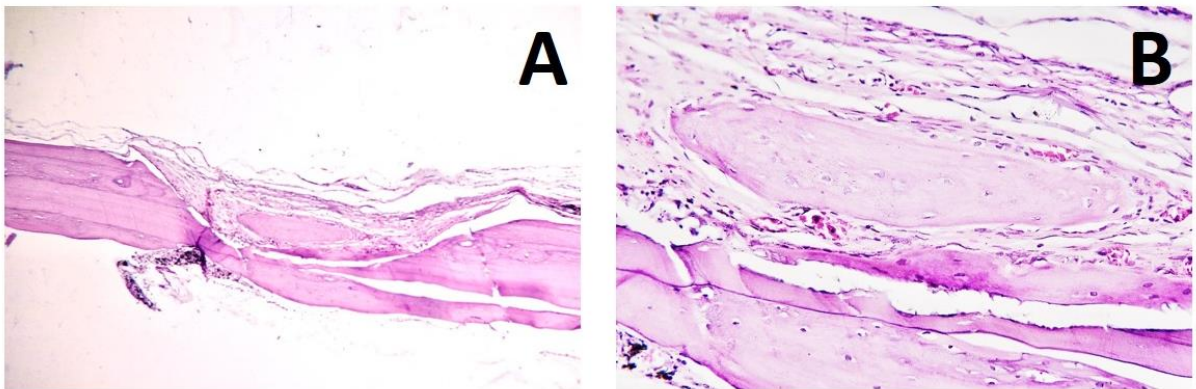


Imagen 1 Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R3-4-GO. A) Se observa la base del hueso en donde se hizo el defecto, no es hueso neoformado) 20x. B) Se observan múltiples células inflamatorias Imagen 40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

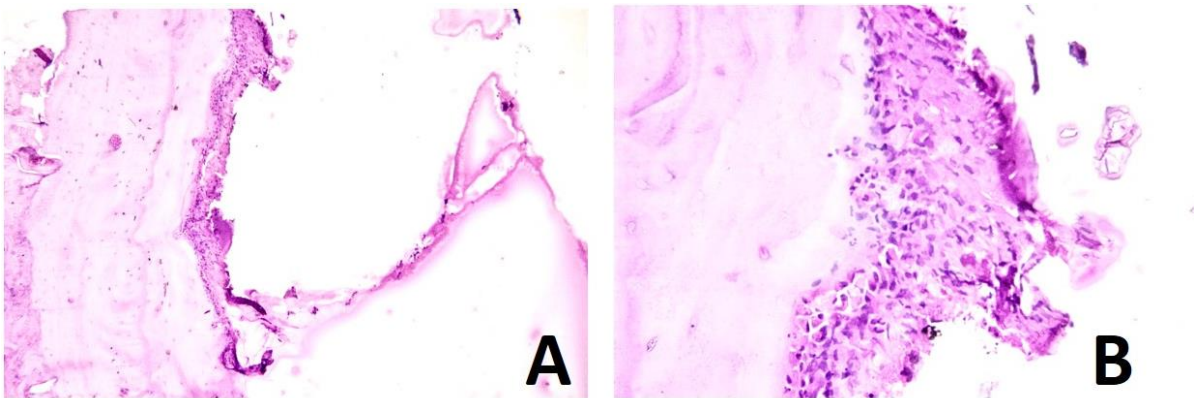


Imagen 2 Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R4-4-C A) se observa en el centro el defecto, a la izquierda se observa la base del hueso.20X B) se observa una inflamación aguda, con tejido fibroso, fibrina, neutrófilos 40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

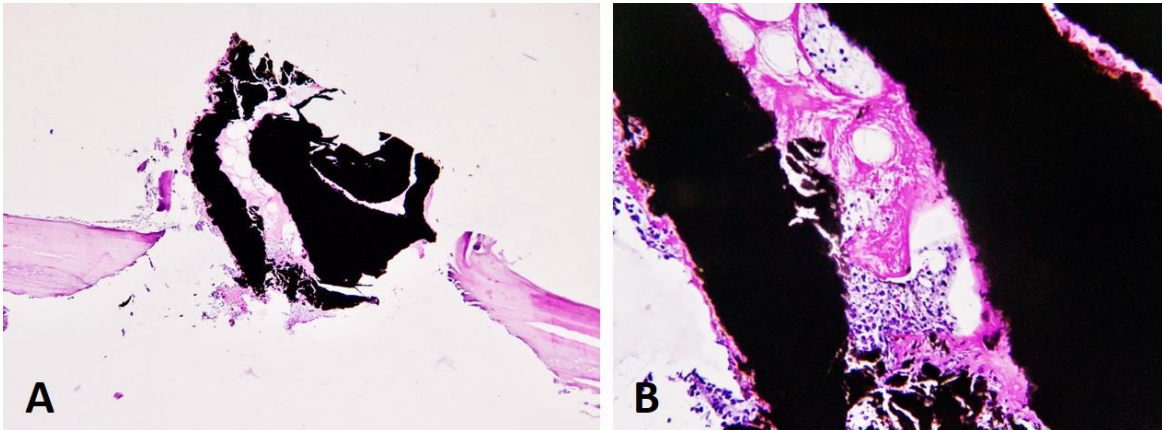


Imagen 3. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R1-16-GOCa A) Se observa el hueso normal a los lados y en el centro el defecto y predomina la presencia del material. B) se observan células inflamatorias y fibrina. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

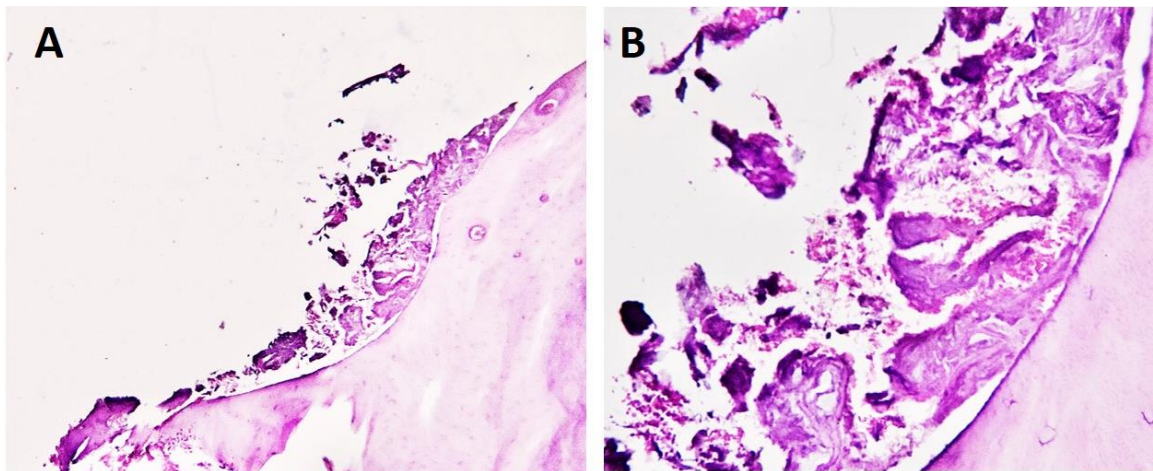


Imagen 4. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R4-16-GO. A) Se observa el defecto a la izquierda y a la derecha el hueso normal.20X B) Se observan múltiples células inflamatorias.40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

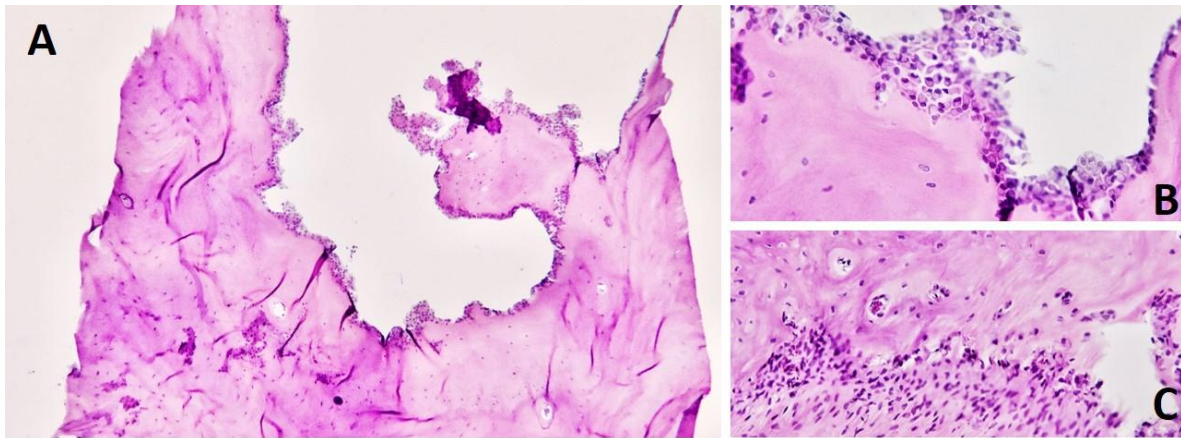


Imagen 5. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R4-16-C. A) Se observa el centro del defecto 20X. B) Se observan células inflamatorias y múltiples osteoblastos 40X .C) acercamiento en donde se observa osteoblastos 40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

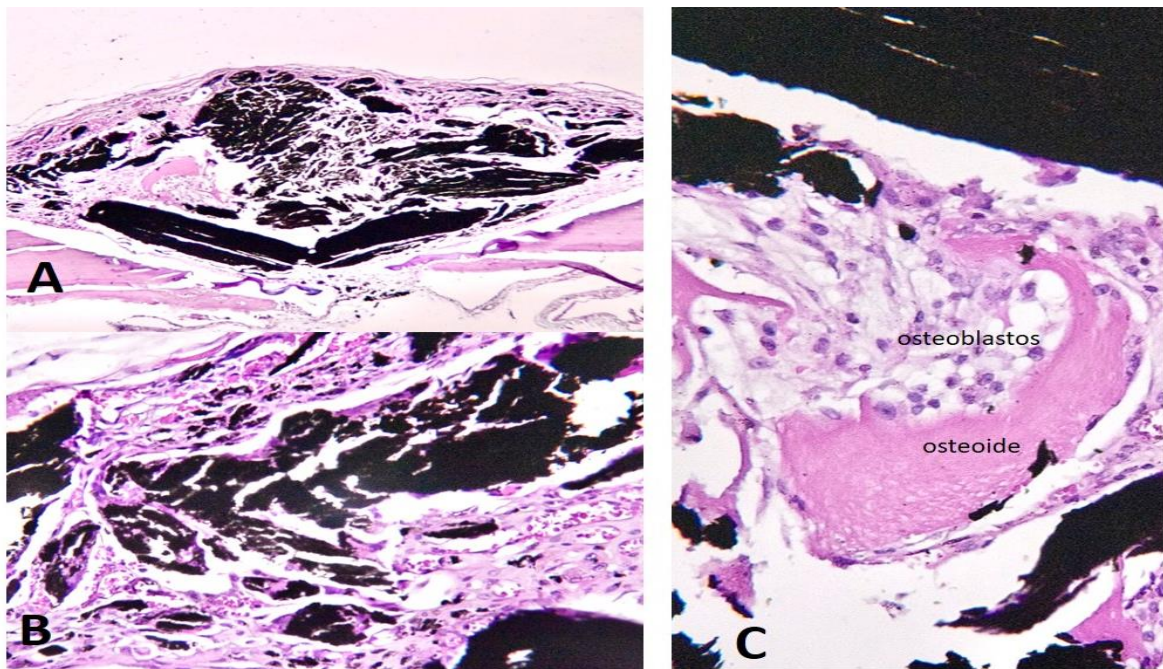


Imagen 6. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R2-45-GOCa. A) Vista panorámica del corte longitudinal. B) Se observa la presencia del material y alrededor de él células inflamatorias y osteoblastos.40X C) acercamiento a la presencia de osteoblastos y tejido osteoide.100 X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

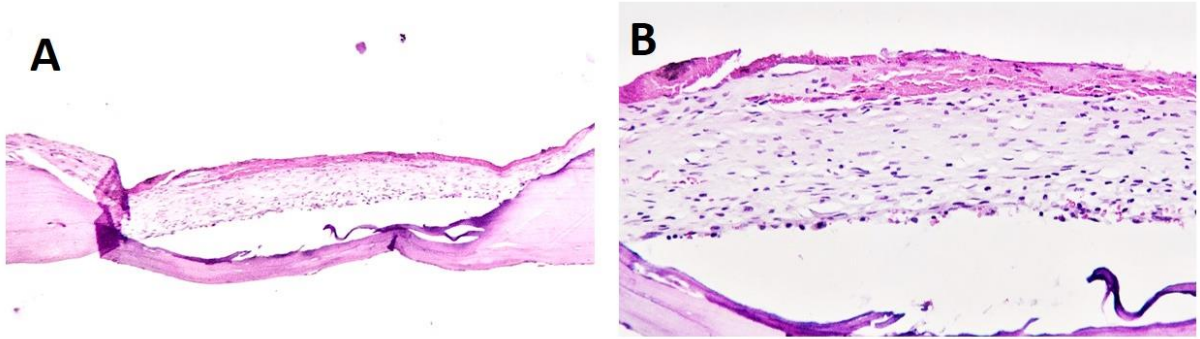


Imagen 7. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R2-45-C. A) Se observa corte longitudinal del defecto. B) Se observa fibrina por arriba, células inflamatorias, no se observa formación de hueso 40X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

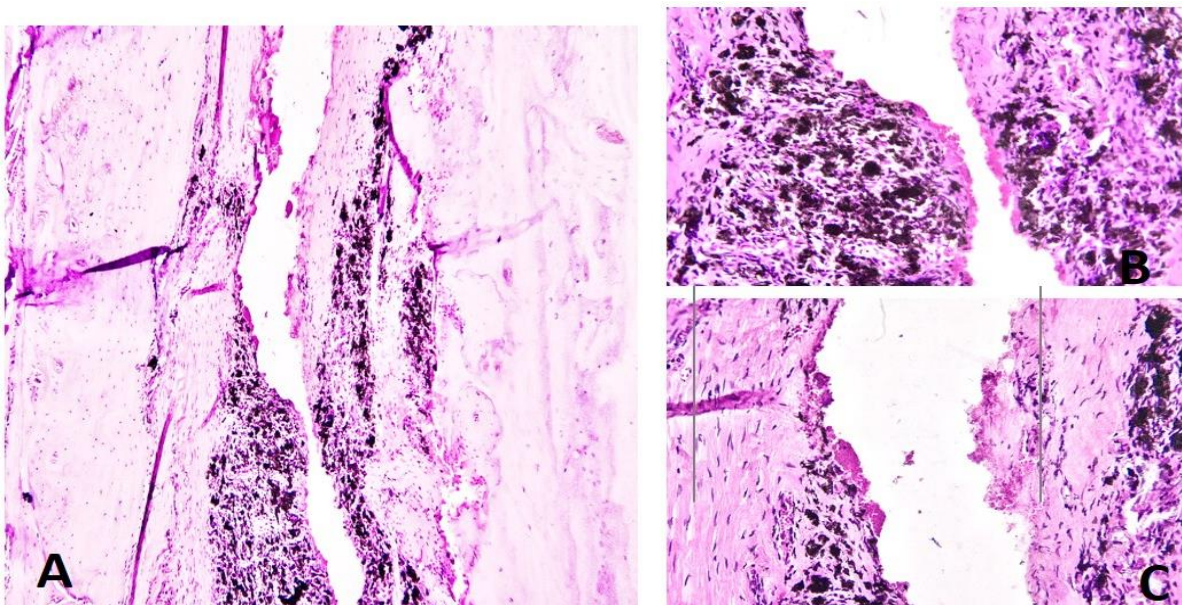


Imagen 8. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R2-45-GO. A) Vista panorámica del corte, se observa el hueso normal a los lados (el corte se cerró al momento del procesamiento de las muestras) B) se observa bastante tejido fibroso alrededor del material. 40X C) magnificación de la muestra.100X. Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.

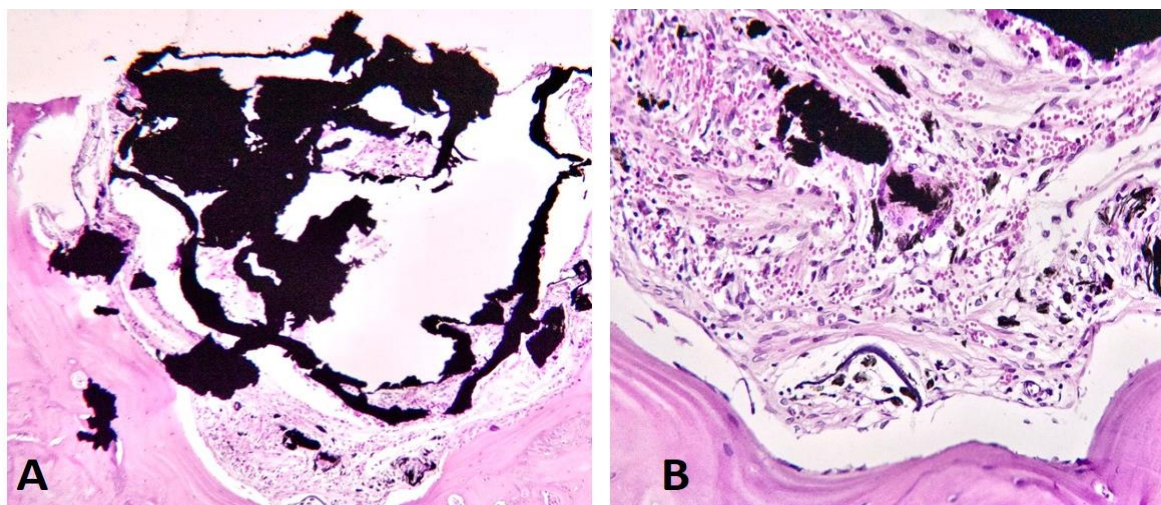


Imagen 9. Micrografía de corte longitudinal del hueso parietal de R4-60-GO. A) Se observa corte longitudinal de la muestra con la presencia de bástate material 20X. B) magnificación de la muestra donde se ve el material fragmentado, signo de que el material si ha sido reabsorbido 40X

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 sumarizados en la Tabla 4 y Figura 12-14.

TABLA 3. Resumen de los indicadores relacionados al proceso inflamatorio observadas en la muestras de tejidos óseos teñidas con hematoxilina y eosina.

ID observación	ID muestra	Patrón de Inflamación	Grado de inflamación
6	R14GC	Mixta	moderado
11	R14C	Aguda	leve
23	R24GC	Aguda	moderado
2	R24C	Ausente	mínima
20	R34GO	Aguda	moderado
29	R34C	Aguda	moderado
17	R44GO	Aguda	moderado
12	R44C	Aguda	leve
5	R116GC	Mixta	leve
9	R116C	Mixta	moderado

25	R216GC	Ausente	mínima
30	R216C	Mixta	moderado
27	R315GO	Mixta	moderado
28	R316C	Ausente	mínima
10	R416GO	Crónica	moderado
14	R416C	Aguda	moderado
8	R145GC	crónica	leve
4	R145C	crónica	leve
24	R245GC	crónica	leve
22	R245C	crónica	leve
19	R345GO	crónica	leve
26	R345C	ausente	mínima
18	R445GO	crónica	leve
15	R445C	crónica	leve
1	R160GC	crónica	moderado
7	R160C	ausente	mínima
21	R260GO	crónica	leve
3	R260C	crónica	mínima
31	R460GO	crónica	moderado
32	R460C	ausente	mínima
13	R460GO	crónica	moderado
16	R460C	ausente	mínima

Tipo de inflamación

Grupo 4 días.

En el grupo control a los 4 días que se indujo el defecto podemos observar que el 100% hubo inflamación aguda al igual que el grupo de óxido de grafeno (GO), y en el grupo de óxido de grafeno con calcio (GOCa) se obtuvo un 50% de las muestras con una inflamación aguda y el otro 50% se encontraba con inflamación mixta.

Grupo 16 días.

En el grupo control a los 16 días se encontró con un 70% con inflamación aguda y un 30% de las muestras con inflamación mixta, en el grupo GO se encontró un 50%

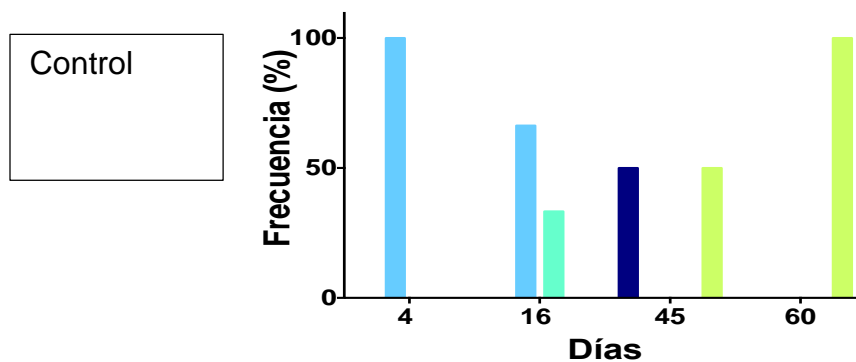
de las muestras con inflamación crónica y un 50% con inflamación mixta; en el grupo GOCa hubo un 50% de inflamación mixta y un 50% de las muestra se encontraban ausentes de inflamación.

Grupo 45 días.

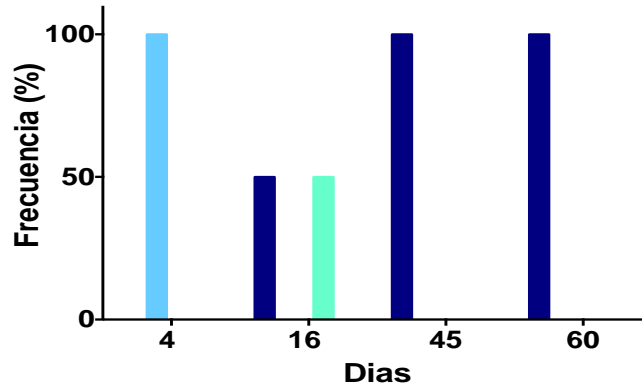
En el grupo control de 45 días hubo un 50% de las muestras con una inflamación tipo crónica y un 50% de las muestras con ausencia de inflamación, en las muestras de GO el 100% de las muestras mostraron una inflamación crónica al igual que en el grupo de GOCa.

Grupo 60 días.

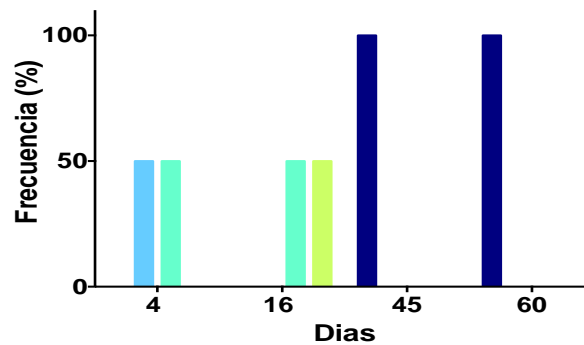
En el grupo control de 60 días se observó un 100% de las muestras ausencia de inflamación, en el grupo GO se pudo observar un 100% de inflamación crónica al igual que en el grupo GOCa.



Óxido de grafeno



Óxido de Grafeno calcio



■ I. Crónica ■ I. Aguda ■ I. Mixta ■ A

FIGURA 12 Porcentaje del tipo de inflamación (inflamación crónica, aguda, mixta, ausente) tinción con hematoxicilina y eosina, muestras a los 4, 16, 45, 60 días.

Grado de inflamación

Grupo 4 días.

En el grupo control se observó un 60% de inflamación leve y un 40% moderado, en el grupo GO se observó un 100% de grado de inflamación moderado al igual que el GOCa.

Grupo 16 días.

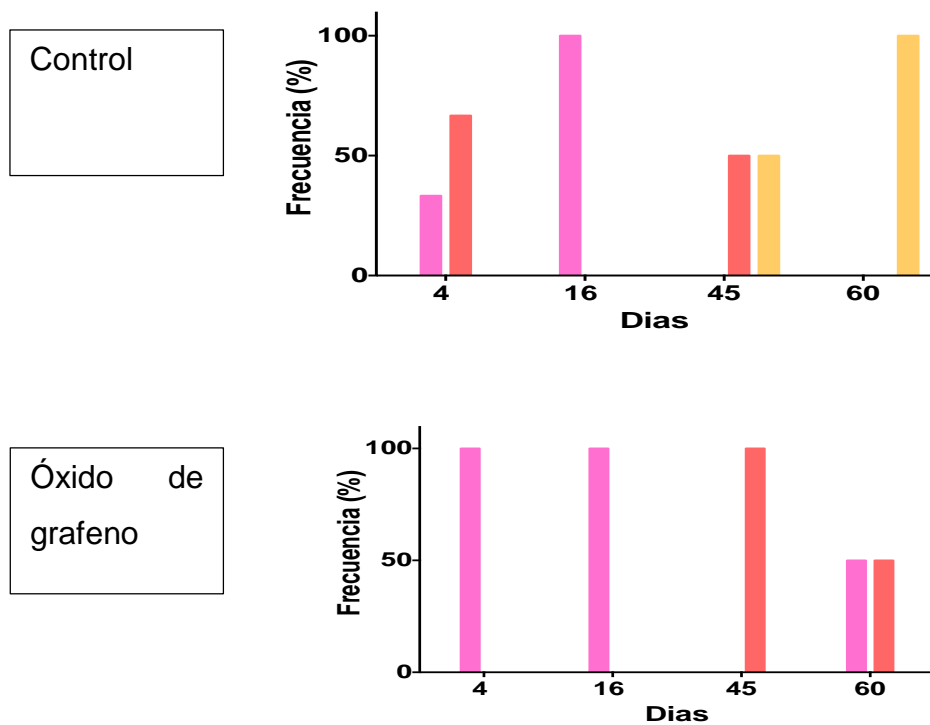
En el grupo control se observó un 100% de inflamación tipo moderado al igual que el GO, en cambio el grupo GOCa se observó un 50% de inflamación de grado leve un 50% de inflamación grado mínimo.

Grupo 45 días.

En el grupo control se observó un porcentaje de grado de inflamación de un 50% leve y un 50% mínimo, en el grupo GO se observó un 100% de grado de inflamación tipo leve al igual que en el grupo GOCa.

Grupo 60 días.

En el grupo control se observó un 100% de grado de inflamación mínimo, en el grupo GO se obtuvo un 50% de grado de inflamación moderado y un 50% grado leve, en el grupo GOCa se observó un porcentaje del 50% correspondiente a grado leve y el otro 50% a grado mínimo.



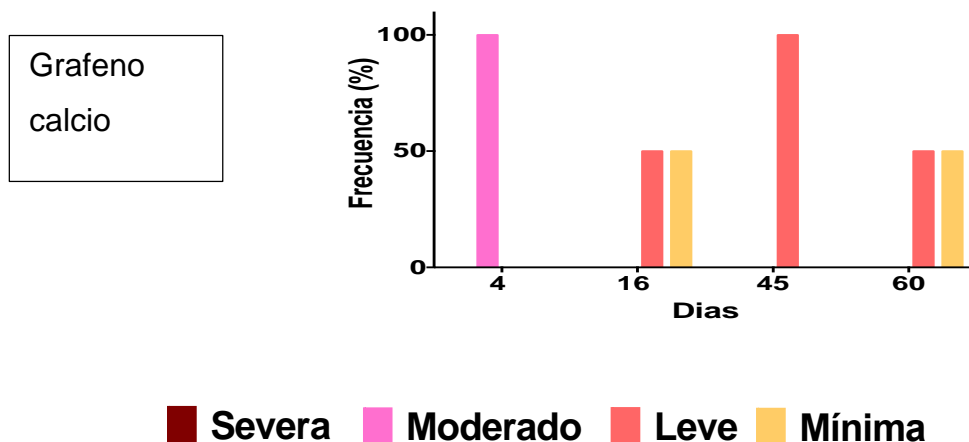


FIGURA 13 Porcentaje del grado de inflamación (severa, moderado, leve, mínimo) tinción con hematoxicilina y eosina, muestras a los 4, 16, 45, 60 días.

Presencia de células.

Grupo 4 días.

En el grupo control se observa escasos neutrófilos y escasos macrófagos, en el grupo GO se observa una población más variada de células encontrando bajos neutrófilos y proporción escasa linfocitos y macrófagos y en el grupo GOCa fue muy parecido al control observando bajo nivel de neutrófilos y no otras líneas celulares.

Grupo 16 días.

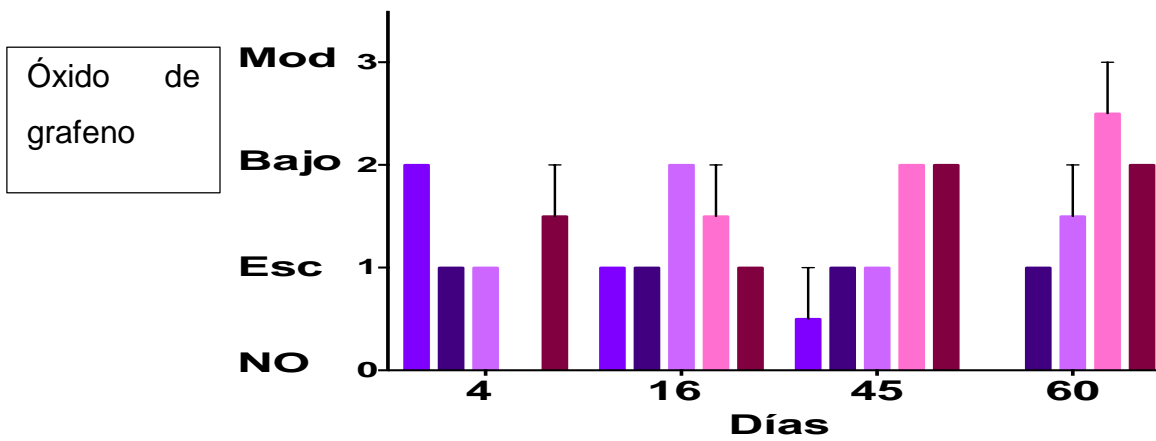
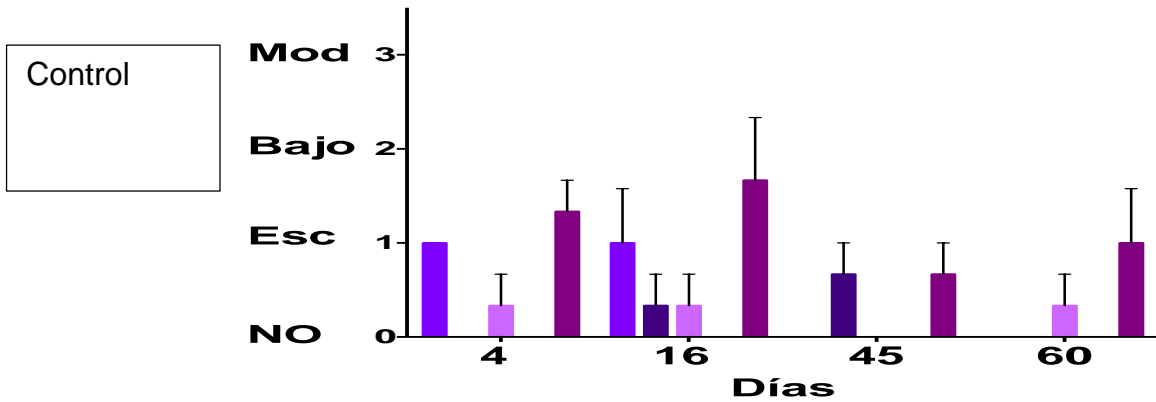
En el grupo control se observó neutrófilos, linfocitos y macrófagos en promedio general de escasas, en el grupo GO se observó más variación de líneas celulares con un promedio escaso de neutrófilos y linfocitos y un promedio bajo de macrófagos y células grandes multinucleadas, en el grupo GOCa se observa un promedio escaso de neutrófilos y macrófagos parecido al grupo control.

Grupo 45 días.

En el grupo control se encontró un promedio escaso de linfocitos, en el grupo GO se observó la presencia de una mayor línea celular con un promedio bajo a escaso de células gigantes multinucleadas, macrófagos, linfocitos y neutrófilos, en el grupo GOCa se encuentra la misma línea celular de moderado a bajo.

Grupo 60 días.

En el grupo control se observó escasa presencia solo de macrófagos, en cambio en el grupo GO y GOCa se observa una mayor línea celular y a mayor proporción.



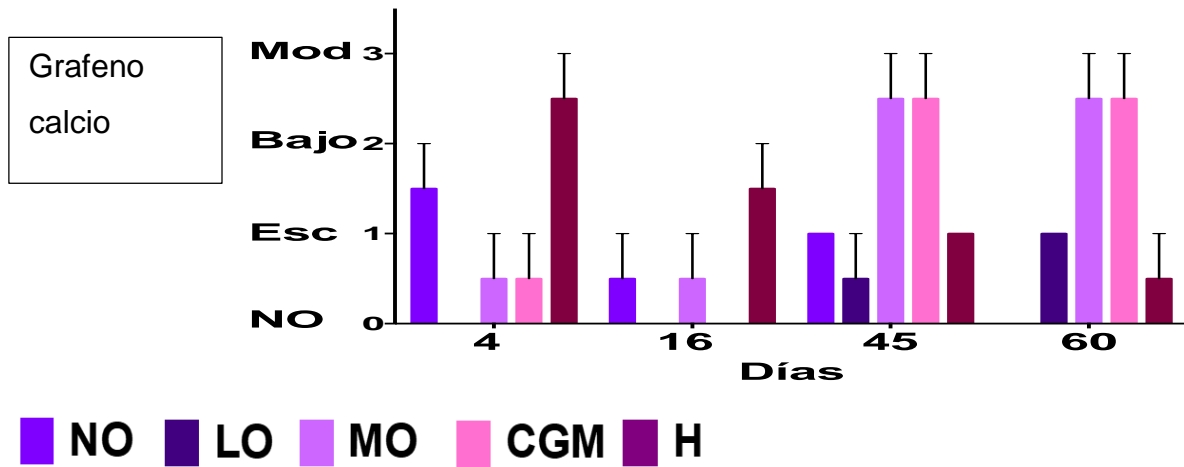


FIGURA 14. Recuento de las células del linaje inmunológico. Células observadas (Tinción con hematoxilina y eosina) en las muestras de tejido óseo procesadas a los 4,16, 45, 60, (NO= neutrófilo, LO=linfocitos MO=macrófagos, CGM= células gigantes multinucleadas, H= hemorragia.)

DISCUSIÓN

La finalidad de la Ingeniería de Tejidos es 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 (10,11) en cuanto a la ingeniería de tejidos óseo su principal finalidad es la de mimetizar el proceso natural de la reparación ósea mediante la inserción de células que induzcan la diferenciación osteoblástica esto es posible con la utilización de matrices tridimensionales biodegradables altamente porosas, tratadas con moléculas de señalización, que después de ser implantadas sobre el defecto se espera que induzcan y dirijan el crecimiento del nuevo tejido. Las células adheridas a la matriz deben proliferar, diferenciarse y organizarse en un tejido normal, mientras que la matriz, según el material utilizado, se metaboliza o degrada. Aunque con esta estrategia se han obtenido buenos resultados, también se encuentran variaciones, dependiendo de la necesidad; por ejemplo, la inyección directa de células o de moléculas de señalización en el sitio del defecto cuando el tejido dañado está confinado a una pequeña región (104).

En Abril del 2014 Chengde Gao *et al.* Reportó el uso de grafeno para mejorar las propiedades mecánicas del vidrio bioactivo nano-58S para la reparación y regeneración ósea; El vidrio bioactivo (58S) ha recibido especial atención como andamio del material para su biodegradabilidad, excelente bioactividad y capacidad de vinculación de carbono. Reacciona con los fluidos fisiológicos para formar enlaces directos con el tejido óseo en el período inicial después de la implantación sin toxicidad, inflamación y respuesta de cuerpo extraño. La liberación de los iones solubles de Si, Ca y P puede activar la expresión génica y estimular la proliferación de osteoblastos para la rápida formación ósea. Los principales obstáculos del 58S son la fragilidad intrínseca, la baja tenacidad a la fractura y la resistencia al

agrietamiento para sostener las cargas transmitidas desde el tejido óseo circundante, lo que se considera uno de los requisitos de los andamios durante el período de la formación de hueso nuevo (105).

Durante esta investigación se reportó el análisis cualitativo y cuantitativo demostró la incorporación exitosa de grafeno en el andamio sin daños estructurales evidentes y pérdida de peso. La resistencia a la compresión óptima y la resistencia a la fractura alcanzaron 48.65 ± 3.19 MPa y 1.94 ± 0.10 MPa · M^{1/2} con un contenido de grafeno de 0.5% en peso, indicando mejoras significativas de 105% y 38% respectivamente. Se encontró que es responsable de la mejora mecánica. Las pruebas simuladas de fluidos corporales y cultivos celulares indicaron una bioactividad y biocompatibilidad favorables del andamio compuesto (105).

Por otra parte, más tarde en el año 2019 Francilio carvalho Oliveira *et al.* Evaluó la acción de los compuestos nanotubos de nano-hidroxiapatita nHAp / carbono con óxidos de grafeno (GNR), denominados nanoribbons de grafeno (nHAp / GNR) para promover la regeneración ósea utilizando un modelo osteoporótico. Produjeron y caracterizaron tres nHAp / GNR diferentes (1, 2 y 3% en peso de GNR) los cuales se utilizaron en 36 ratas Wistar. Antes de la implantación, la osteoporosis se indujo mediante ooforectomía en ratas hembras. Después de 45 días, se infligió una fractura de tibia utilizando un taladro de 3,0 mm. Luego, los animales se separaron en seis grupos de muestra en dos períodos de tiempo diferentes de 21 y 45 días. Las lesiones se rellenaron con 3 mg de una de las muestras anteriores y después de su eutanasia se realizaron análisis histológicos, bioquímicos y radiográficos (106).

Como resultado se obtuvo que tanto la nHAp como la GNR mostraron actividad osteoconductor. Sin embargo, el nHAp / GNR exhibió actividad regenerativa proporcional a su concentración, siguiendo el orden de 3% .2% .1% en peso. Por lo tanto, todas las nano partículas analizadas promovieron la regeneración ósea en ratas osteoporóticas independientemente del tiempo analizado (106).

Por lo mencionado podemos resumir que el éxito de la ingeniería del tejido óseo depende en gran medida de la funcionalidad del andamio. Identificar nuevos materiales de andamio con propiedades con buena biocompatibilidad, biodegradación controlada no tóxica, capacidad para apoyar la diferenciación celular, crecimiento, y proliferación, y una resistencia mecánica adecuada, es crucial para la eficiencia del proceso de regeneración de tejidos.

Con el fin de abordar las deficiencias de los andamios óseos comunes, nuestro objetivo fue analizar la capacidad de los derivados de grafeno GO y GOCa 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 determinaron los grupos de 4, 16,45 y 60 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 (GO) y un derivado que contiene calcio, óxido de grafeno calcio (GOCa).

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 GO por sí solo, es decir, en la mayoría de los estudios esta derivatizado con cerámicas y/o polímeros.

Es así como se incluyó el GO en este estudio, con la finalidad de explorar su efecto en solitario. Como parte del análisis se realizó también la evaluación del proceso inflamatorio con el paso del tiempo de las biopsias procesadas, donde se observó que a los 4 días posteriores a la colocación del injerto existía un mayor grado de inflamación en los grupos injertados en comparación el grupo control. Tal resultado es “aceptable”, ya que el tipo de inflamación observada (fue moderada, el control presentó inflamación de moderada a leve) es atribuida a la presencia del material, que por sí solo potencializa el proceso inflamatorio, en su calidad de agente externo,

ajeno al tejido y al ambiente celular (ningún material injertado es inocuo totalmente). Sin embargo a los 16 días se pudo observar una mejoría en el grupo GOCa cuando se comparó con respecto al grupo control y al grupo del GO, indicando que existe una mayor asimilación del GOCa o que existe una mayor respuesta de restauración del defecto. A los 60 días los resultados fueron similares, es decir, el grupo GOCa siguieron la tendencia de mejoría, teniendo menor grado de inflamación (mínimo y leve), diferente al grupo GO, el cual aún presentaba inflamación de moderada a leve. Este resultado sugiere que el material GOCa tiene un mayor grado de asimilación que el GO.

Por otra parte, la presencia del linaje de células inmunológico (linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, células cebadas, células plasmáticas, eosinófilos y hemorragia) fue mayor en los grupos injertados con respecto al grupo control. Este resultado es de alguna manera esperado, ya que, como lo mencionamos anteriormente la presencia de un agente extraño, como lo son los derivados del grafeno, “despierta” al sistema inmune promoviendo entre otros mecanismos, la inflamación y como consecuencia mayor movilización de células implicadas en procesos inmunológicos, aunque no en un grado que sugiera o se sospeche de rechazo de alguno de los materiales. Cabe destacar, que la movilización celular fue menor en el grupo GOCa con respecto al grupo GO, durante los primeros días, aumentando gradualmente, hasta llegar resultados similares a los 60 días. Sin embargo el GOCa, presentó menor grado de hemorragia al inicio, durante y al final del tiempo de observación (con respecto al GO).

En resumen observamos que el grupo GO despierta más rápido el proceso inflamatorio (ya que desde el día 16 se puede observar mayor movilización celular) en comparación al grupo GOCa (donde solo se ve un aumento la población celular a los 60 días), a la par de un menor grado de inflamación, que se puede traducir en menor daño a los tejidos circundantes.

Por otro lado, los resultados histológicos mostraron una recuperación ósea similar entre los defectos injertados utilizando los derivados de grafeno, GO y GOCa con respecto al grupo control (defecto sin injerto). Sin embargo, notamos, que el hueso recién formado en los defectos injertados, aumentó desde la periferia hasta el centro del defecto óseo, en lugar de solo en la frontera, como se observó en los grupos controles. Esto indica que la presencia del material, favorece el tránsito de formación ósea, sugiriendo que los derivados poseen propiedades osteoconductoras.

De igual forma, en el grupo de 4 días (con GOCa) se pudo observar una mayor respuesta osteoblastica (moderada) en comparación al grupo control con una respuesta osteoblastica mínima.

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.

CONCLUSIONES

El presente estudio fue diseñado para analizar histológicamente los derivados de grafeno (GO y GOCa) como andamios moleculares para la restauración ósea en defectos creados quirúrgicamente en cráneo de rata. El hueso recién formado en el defecto quirúrgico se evaluó mediante análisis histológico visual y un cuestionario previamente elaborado. Los resultados obtenidos con la colocación del injerto GO y GOCa no demostraron una curación ósea superior a los grupos controles, sin embargo podemos concluir que el material sirve como andamio para favorecer el tránsito de formación ósea (osteoconductor), ya que se encontró tejido óseo entre el material injertado en el centro del defecto en comparación a los grupos controles que solo se encontraba tejido óseo en la periferia del defecto.

Durante esta investigación se demostró la biocompatibilidad de los materiales analizados era adecuada una vez que la respuesta inflamatoria y la organización de los tejidos eran similares a los grupos controles. Además se pudo concluir que el GOCa tiene una mayor biocompatibilidad en comparación al GO, ya que este tuvo una menor respuesta de línea celular por lo que tiene un menor grado de inflamación y por lo tanto menor daño a los tejidos circundantes, además se puede concluir que el material GOCa tiene un mayor grado de asimilación en comparación al GO ya que en el grado de inflamación se puede observar una mejoría en el grupo 60 días.

Se pudo concluir que el material es eliminado gradualmente con el tiempo, sin embargo aún se pudo observar material en los grupos de 60 días, por lo que es necesario muestras a más tiempo.

Los defectos de control no fueron reparados completamente por el hueso en ninguno de los 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.

RECOMENDACIONES

El presente estudio mostró que el GO y GOCa 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 el crecimiento celular, marcadores inmunológicos, implicados en proceso inflamatorio, aumentar el tiempo de estudio hasta tener una formación completa del hueso para analizar la calidad del hueso neoformado, utilizar ratas seniles o enfermas etc

BIBLIOGRAFÍA

1. JD. ME. Endodoncia. Interamericana-Mc Graw Hill; 1995. 250 p.
2. CANALDA SAHLI C, BRAU AGUADÉ E. Endodoncia TÉCNICAS CLÍNICAS Y BASES CIENTÍFICAS. 3era ed. elsevier masson;
3. Hargreaves K, Cohen MS. vías de la pulpa. 10th ed. Elsevier Inc;
4. Review CC. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. 2018;90:90–9.
5. Ñ AMP, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. Elsevier. 2007;28:4023–32.
6. Feli P, Cintra A, Gomes-filho E, Nagata H, Gustavo L, Melo N, et al. 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 Impl Res. 2011;384–8.
7. Terezinha A, Novellino N, Calasans-maia J, Calasans-maia MD. Alveolar bone repair with strontium- containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. 2018;1–9.
8. WP. RM y. Histología: Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Ed. Paname.; 2013.
9. Vandam L, Covino B. Tribute to the Vacantis.
10. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. 1993;920–6.
11. Paredes-Puerto¹ A, Camacho-Villegas¹ T, Vallejo-Cardona¹ A, Esquivel-Solís² H. Colágenas Recombinantes para Andamios de Ingeniería de Tejidos. Rev Mex Ing BIOMÉDICA. 2017;38(1):103–14.

12. Navarro DM. Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. *Rev Cubana Estomatol.* 2014;51(3):288–304.
13. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol.* 2006;569–76.
14. Maguire TJ, Yarmush ML. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine : History , Progress , and Challenges* Franc. 2011;
15. Rheinwald JG GH. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes the formation of keratinizing colonies from single cells.pdf. 1975;
16. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceeding Natl Acad Sci.* 1979;76(11):5665–8.
17. Connor NEO. GRAFTING OF BURNS WITH CULTURED EPITHELIUM PREPARED FROM AUTOLOGOUS EPIDERMAL CELLS. 1981;75–8.
18. Bártolo PJ, Chua CK, Almeida HA, Chou SM LA. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends. *Virtual Phys Prototyp.* 2009;
19. Bartolo P, Kruth JP, Silva J, Levy G MAR et al. Biomedical production of implants by additive electro-chemical and physical processes. Elsevier. 2012;635–55.
20. Vaezi M YS. Extrusion-based additive manufacturing of PEEK for biomedical applications. *VIRTUAL Phys Prototyp.* 2015;
21. 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.* 2014;
22. François Berthiaume, Timothy J. Maguire and MLY. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges.* *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2011;

23. Aghaloo TL, Felsenfeld AL. Principles of Repair and Grafting of Bone and Cartilage [Internet]. Current Therapy in Oral and Maxillofacial Surgery. Elsevier Inc.; 2012. 19–26 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4160-2527-6.00004-9>
24. Constantino PD FC. Synthetic bone graft substitutes. Otolaryngol Clin North Am. 1997;
25. Thomas J. Cypher, DPM Jordan P. Grossman D. Biological Principles of Bone Graft Healing. J Foot Ankle Surg. 1996;
26. Alkhraisat MHA. BIOACTIVIDAD DE CEMENTOS FOSFATOS CÁLCICOS SUSTITUIDOS CON ESTRONCIO Y SU APLICACIÓN EN REGENERACIÓN ÓSEA. 2008.
27. JT. T. The stem cell of the osteoblast. In: Bilizekian J, Raisz L, Roduo G (eds) Principles of bone biology. San Diego, CA Acad. 1996;
28. Kurz LT, Garfin SR BJ. Harvesting autogenous iliac bone grafts: A review of complications and techniques. 1989;
29. Mankin HJ GM. Long term results of allograft replacement in the management of bone tumours. Clin Orthop. 1996;
30. Benezra Rosen V, Hobbs LW SM. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxiapatites used as bone graft substitute materials. Biomaterials. 2002;
31. MP. LX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. Ann Biomed Eng. 2004;
32. Antonios G. Mikos*, Amy J. Thorsen, Lisa A. Czerwonka YB and TR. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. Polym (Guildf). 1944;
33. Oh SH, Park IK, Kim JM LJ. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. Biomaterials.

- 2007;
34. Sa M-W. KJ. 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;
 35. Loh QL CC. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engeneer.* 2013;
 36. PX. M. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater Today.* 2004;
 37. Kretlow JD MA. Review: Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng.* 2004;
 38. Moradi A, Dalilottojari A, Pingguan-Murphy B DI. Fabrication and characterization of elastomeric scaffolds comprised of a citric acid-based polyester/hydroxyapatite microcomposite. *Mater Des.* 2013;
 39. Ali Akbari Ghavimi S, Ebrahimzadeh MH, Shokrgozar MA, Solati-Hashjin M AON. Effect of starch content on the biodegradation of polycaprolactone/starch composite for fabricating in situ pore-forming scaffolds. Elsevier. 2015;
 40. Ishaug SL, Yaszemski MJ, Bizios R MA. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res.* 1994;
 41. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials.* Elsevier. 2003;
 42. Short AR, Koralla D, Deshmukh A, Wissel B, Stocker B CM et al. Hydrogels that allow and facilitate bone repair, remodeling, and regeneration. *J Mater Chem B.* 2015;
 43. Ratner BD, Hoffman AS SFL. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* Massachusetts Acad Press. 2004;
 44. Lee SH SH. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone

- and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;
45. MORADI A. Development of bovine cartilage extracellular matrix as a potential scaffold for chondrogenic induction of human dermal fibroblasts. *Fac Eng Univ MALAYA KUALA LUMPUR.* 2015;
 46. 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.* 2016;
 47. Pei M, Li J, Shoukry M ZY. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. *Eur Cells Mater.* 2011;
 48. 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.* 2011;
 49. Koob S, Torio-Padron N, Stark GB, Hannig C, Stankovic Z FG. Bone Formation and Neovascularization Mediated by Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Cells in Critical-Sized Calvarial Defects. *Tissue Engneer.* 2010;
 50. AL. CS. Hernias through donor sites for iliac-bone grafts. *J Bone Jt Surg Am.* 1983;
 51. SD. KS. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;
 52. Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM CA. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res.* 1999;
 53. Yarlagadda, Prasad K.D.V.; | Chandrasekharan M| SJ. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng.* 2005;
 54. PE. BR. The chemical anatomy of bone: I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. *J Bone Jt Surg Am.* 1969;

55. QQ. DP. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999;
56. Machado CP, Sartoretto SC, Alves AT, Lima IB, Rossi AM GJ et al. Histomorphometric evaluation of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite as bone substitute in sheep. *Braz Oral Res*. 2016;
57. Hasegawa M DYU. Cell-mediated bioresorption of sintered carbonate apatite in rabbits. *J Bone Jt Surg Br*. 2003;
58. Resende RF, Fernandes GV, Santos SR, Rossi AM, Lima I GJ et al. Long-term biocompatibility evaluation of 0.5 % zinc containing hydroxyapatite in rabbits. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;
59. Hesarakı S, Nazarian H P-MMB. 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;
60. Liao S, Watari F, Xu G, Ngiam M RSC. Morphological effects of variant carbonates in biomimetic hydroxyapatite. *Mater Lett*. 2007;
61. D. S. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater*. 2010;
62. Cox SC, Jamshidi P GLM. Low temperature aqueous precipitation of needle-like nanophase hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;
63. Kokubo T KHK. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. Elsevier. 2003;
64. Cascone M, Barbani N, Cristallini C, Giusti P CGL. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2001;
65. Kang HG KSL. Novel porous gelatin scaffolds by overrun/particle leaching process for tissue engineering applications. *J Biomed*. 2006;

66. Roether J, Boccaccini AR, Hench L, Maquet V GSJ. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002;
67. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T KD. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int J Polym Sci*. 2011;
68. Woo BH, Kostanski JW, Gebrekidan S, Dani BA TBD. Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly (D, L-lactide) leuprolide microspheres. *J Control Release*. 2001;
69. Du C, Cui F ZX de G. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res*. 1999;
70. Bigi A, Boanini E, Panzavolta S RNR. Bone like apatite growth on hydroxyapatite–gelatin sponges from simulated body fluid. *J Biomed*. 2002;
71. Banerjee SS, Tarafder S, Davies NM BAB. Understanding the influence of MgO and SrO binary doping on the mechanical and biological properties of β -TCP ceramics. *Act a Biomater*. 2010;
72. Li F, Feng QL, Cui FZ LHS. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. *Surf Coat Technol*. 2002;
73. Farack J, Wolf-Brandstetter C, Glorius S, Nies B, Standke G QP 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;
74. Hermawan H DDM. Degradable metallic biomaterials: design and development of Fe-Mn alloys for stents. *J Biomed*. 2010;
75. Quadbeck P, Hauser R, Kümmel K, Standke G, Stephani G NB et al. Iron based cellular metals for degradable synthetic bone replacement. . PM2010 World Congr Florenz, Italy. 2010;

76. Yusop A, Bakir A, Shaharom NA AKMH. Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review. *Int J Biomater*. 2012;
77. Bobyn J, Stackpool GJ, Hacking SA TMK. Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. *Bone Jt Surg Br*. 1999;
78. Bobyn JD, Toh KK, Hacking SA TMK. Tissue response to porous tantalum acetabular cups: a canine model. *J Arthroplast*. 1999;
79. Adams JE, Zobitz ME, Reach JS Jr, An KN LDS. Canine carpal joint fusion: a model for four-corner arthrodesis using a porous tantalum implant. *J Hand Surg Am*. 2005;
80. Meneghini RM LDH. Use of porous tantalum metaphyseal cones for severe tibial bone loss during revision total knee replacement: surgical technique. *J Bone Jt Surg Am*. 2009;
81. Vehof JW SPJ. Bone formation in calcium-phosphate-coated titanium mesh. *Biomaterials*. 2000;
82. Wu C, Zhou Y, Fan W, Han P, Chang J YJ et al. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;
83. Gago I, Molina I, León G, Miguel B, Grafeno PC, Biomédica I. Introducción al estudio de las propiedades antibacterianas del grafeno Introduction to the study of the antibacterial properties of graphene. *CISDE*. 2016;87–94.
84. Kumar A, Lee CH. Synthesis and Biomedical Applications of Graphene: Present and Future Trends. *INTECH open Sci open mind*. 2013;55–75.
85. Kim H, Jiao A HN et al. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;
86. Lee C., X. Wei JWK and J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science (80-)*. 2008;385–388.

87. Khare, R. SLMJ et al. Coupled quantum mechanical/molecular mechanical modeling of the fracture of defective carbon nanotubes and graphene sheets. *Phys Rev B*. 2007;
88. Loh K. P., Q. Bao PKA and J. The chemistry of graphene. *J Mater Chem*. 2010;
89. Song Y. J. WLW and X. Colorimetric biosensin using smart materials. *Adv Mater*. 2011;
90. Z. LF and. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine*. 2011;
91. Goenka, S. VS and S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J Control Release*. 2014;
92. Liu J. LC and D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater*. 2013;
93. 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;
94. Loh KP, Bao Q, Ang PK, Yang J. The chemistry of graphene. *R Soc Chem*. 2010;2277–89.
95. Nanotubes GC, Ryoo S, Kim Y, Kim M, Min D. Behaviors of NIH-3T3 Fibroblasts on. 2010;4(11):6587–98.
96. Akhavan O, Ghaderi E. Graphene Nanomesh Promises Extremely Efficient In Vivo Photothermal Therapy. *small*. 2013;1–9.
97. 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>

98. Ferrari AC, Meyer JC, Scardaci V, Casiraghi C, Lazzeri M, Mauri F, et al. Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers. *Am Phys Soc.* 2006;187401(NOVEMBER):1–4.
99. Sánchez CA. OBTENCIÓN DE GRAFENO MEDIANTE MÉTODOS QUÍMICOS DE EXFOLIACIÓN. Universidad Pontificia Comillas; 2013.
100. Zhu BY, Murali S, Cai W, Li X, Suk JW, Potts JR, et al. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv Mater.* 2010;3906–24.
101. Chung C, Kim Y, Shin D, Ryoo S, Hong BHEE, Min D. Biomedical Applications of Graphene and Graphene Oxide. *Am Chem Soc.* 2013;2211–24.
102. Silvia M, Zaputovich V. Uso y aplicaciones de la inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-ghrelina para el estudio de la pulpa dentaria. *Rev la Fac Med.* 2016;81–8.
103. Martín-Lacave, Inés, García-Caballero T. Atlas de inmunohistoquímica: Caracterización de células, tejidos y órganos normales. 2012. 3–4 p.
104. Estrada, Catalina; Paz, Ana Cristina; López LE. INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO: Consideraciones Básicas. *Rev EIA.* 2006;
105. Gao C, Liu T, Shuai C, Peng S. Enhancement mechanisms of graphene in nano-58S bioactive glass scaffold: mechanical and biological performance. *Sci Rep.* :1–10.
106. Gonçalves DS, Mendes MS, De GO, Gusmão M, Viana C, Marciano R, et al. High loads of nano-hydroxyapatite / graphene nanoribbon composites guided bone regeneration using an osteoporotic animal model. 2019;865–74.