



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSTGRADO

**NEOFORMACIÓN ÓSEA EN
ALVEOLOS TRATADOS CON Y SIN
APLICACIÓN DE LÁSER DE BAJA
INTENSIDAD UTILIZANDO
HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA, EN
MANDÍBULA DE RATAS.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA

CRISTINA LIZBET RUIZ QUILCAT

LIMA - PERÚ

2017

ASESORES

Carlos Espinoza Montes

Mg. Departamento Académico de Medicina y Cirugía Bucomaxilofacial

DAMCIBUM

CO-ASESORES

Marco Alarcón

Esp. Mg. Departamento Académico Clínica del Adulto DACE

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo principalmente a Dios, por brindarme la dicha de la vida, la salud y el bienestar físico y espiritual; además de permitirme haber llegado a esta etapa de mi vida profesional. A mis padres, como agradecimiento a su esfuerzo, amor y apoyo incondicional, durante mi formación tanto personal como académica. A mis hermanas, por su paciencia y apoyo constante durante mi formación profesional. A mis asesores y principalmente al Dr. Roberto Valencia León, por brindarme su guía y sabiduría en el desarrollo en las diferentes etapas de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque siempre me guía y me bendice.

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por haberme abierto las puertas de este prestigioso templo del saber.

A mis docentes por entregar a la sociedad buenos profesionales capaces para el desarrollo en el campo de la investigación en la salud y bienestar de la comunidad de nuestro país.

A todas aquellas personas que contribuyeron; en especial, con mucho cariño a mis asesores, el Mg CD Carlos Espinoza y el Mg Esp. Marco Antonio Alarcón, por su asesoramiento y dedicación en la elaboración del presente trabajo de investigación.

A la Mg CD Katty Ríos Villasis por su colaboración durante todo el proceso de este trabajo.

A la colaboración y asesoramiento de la Mg MV Sandra Bezada Quintana en la ejecución del presente proyecto, con respecto al manejo de los animales en las diferentes etapas de esta investigación.

A los operados de las intervenciones quirúrgicas, el Mg Esp. Emil Correa Quispilaya y el Esp CD Jorge Huamani Mamani, por la dedicación que le brindaron a este proyecto, así como su disponibilidad de tiempo.

Agradezco al especialista de láser, el Esp CD Marcos Cueva Cueto, por su tiempo y colaboración en la capacitación del investigador, así como para el manejo del equipo de láser.

Finalmente, al Sr. Luis Ángel Gómez por su apoyo incondicional y desinteresado durante la ejecución de esta investigación.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La presente Tesis ha sido totalmente autofinanciada.

DECLARACIÓN DEL AUTOR

La presente Tesis es un Trabajo de Investigación de Grado original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto.

No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNO	: Densidad de la Neoformación ósea
TLBI	: Terapia de láser de baja intensidad
LASER	: Amplificación de luz por emisión estimulada de la radiación
nm	: nanómetros
cm	: centímetros
cm ²	: centímetros cuadrados
mW	: miliwatts ²
%	: Porcentaje
LED	: Diodos emisores de luz
HeNe	: Helio neón
HeNeAs	: Helio neón arseniato
Nd:YAG	: Oxido de itrio aluminio dopado con Neodimio
Ga-As	: Galio-arseniato
GaAlAs	: Galio aluminio arseniuro
CCO	: Citocromo c oxidasa
NO	: Óxido nítrico
ATP	: AdenosinTrifosfato
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
SOD	: Superóxido dismutasa
cAMP	: Monofosfato de adenosina cíclico
PKD	: Proteína quinasa D
NF-kB	: Factor kappa B nuclear

Ref-1	: Factor activador redox-1
HIF-1	: Factor inducible por hipoxia
SBI	: índice del sangrado al sondaje
PD	: Profundidad de sondaje
mm	: milímetros
GCF	: Fluido gingival crevicular
LIPUS	: Baja intensidad de ultrasonido
RFA	: Análisis de frecuencia de resonancia
ISQ	: Estabilidad inicial del implante
CCI	: Coeficiente de correlación intraclase
SENASA	: Servicio Nacional de Sanidad Agraria
INS	: Instituto Nacional de Salud

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I.INTRODUCCIÓN	1
II.PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	2
II.1. Planteamiento del problema	2
III.MARCO CONCEPTUAL	4
IV.JUSTIFICACIÓN	22
V.OBJETIVOS	24
V.1. Objetivo general	24
V.2. Objetivos específicos	24
VI.HIPÓTESIS	25
VII.MATERIAL Y MÉTODOS	26
VII.1. Diseño del estudio	26
VII.2. Población	26
VII.3. Muestra	26
VII.3.1. Criterios de selección	26
VII.4. Operacionalización de Variables	27
VII.5. Procedimientos y/o Técnicas	27
VII.6. Consideraciones éticas	37
VII.7. Plan de análisis	38
VIII.RESULTADOS	40
IX.DISCUSIÓN	44
X.CONCLUSIONES	49
XI.RECOMENDACIONES	50
XII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

- Tabla 1. Comparación la densidad de la neoformación ósea en los alveolos sin aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.** 42
- Tabla 2. Comparación la densidad de la neoformación ósea en los alveolos con aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.** 43
- Tabla 3. Comparación la densidad de la neoformación ósea en los alveolos con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.** 44

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue comparar la densidad de la neoformación ósea (DNO) de los alveolos dentales tratados con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad (TLBI); para lo cual, se realizó un estudio experimental en 20 ratas Holtzman macho albinas. A cada espécimen se le extrajeron los primeros molares inferiores bilateralmente; asignándose al azar el lado con la TLBI (grupo experimental) sometido a una aplicación interdiaria de 40mW por 20 segundos, por 6 días y sin la TLBI (grupo control). Posteriormente, las ratas fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos según fecha de sacrificio (7 y 14 días); y se subdividió en 10 alveolos por subgrupo. El análisis de la DNO histológica fue evaluado mediante la técnica de la histomorfometría ósea. Los datos fueron analizados estadísticamente (T-Student; $p < 0,05$). La DNO en los alveolos con y sin TLBI a los 7 días no mostró diferencia estadísticamente significativa; empero, a los 14 días, si mostró diferencia con un $p = 0,017$, obteniéndose una DNO entre los grupos con y sin TLBI de 55,24% y 69,24%, respectivamente. Concluimos que la TLBI, no influye en la DNO en alveolos post-extracción en mandíbula de ratas.

Palabras Clave: Terapia por Láser, Regeneración ósea, ratas Holtzman.

ABSTRACT

The purpose of the research was to compare the density of bone formation (DBF) in the sockets treated with and without low level laser therapy (LLLT); for which, twenty male Sprague Dawly albino rats were used in this experimental study. Each specimen was extracted lower first molars bilaterally; randomly selecting the side with LLLT (experimental group) every two days application of 40mW for 20 seconds, for 6 days, and without LLLT (control group). After, rats were randomly divided into two groups according to the time of sacrifice (7 and 14 days); and was subdivided into ten sockets by subgroup. Histological analysis was evaluated by the histomorphometry technique. The data were statistically analyzed (T-Student, $p < 0.05$). The area of bone trabeculae in the sockets with and without LLLT at 7 days showed no significant difference; however, at 14 days, showed difference ($p = 0.017$), having between groups with and without LLLT of 55.24% and 69.24%, respectively. We conclude that LLLT does not influence the DBF in post-extraction sockets in rats jaw.

Key Words: Low-Level Laser Therapy, Bone Regeneration, Sprague Dawly rats.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han debatido diversos métodos que garanticen resultados óptimos en la reparación ósea. Con ello, se están desarrollando innovadores enfoques clínicos que buscan acelerar la cicatrización ósea del alveolo; siendo este un proceso complejo que requiere diversos sucesos biológicos y celulares. Es por ello, que estos enfoques buscan mejorar estas condiciones, así como, acelerar la reparación del tejido óseo alveolar.¹⁻³

El láser es una nueva herramienta tecnológica que ha sido incorporada en el campo de la Odontología, la cual trae una amplia gama de aplicaciones, aparentemente ventajosas para el paciente durante los tratamientos convencionales. Esta herramienta contiene diferentes sustancias que al excitarse, por una fuente de energía, producen un haz de luz. Según su clasificación en base a su intensidad, existen dos categorías: Láser de alta intensidad o también conocidos como quirúrgicos, con la finalidad de efectos de corte, vaporización y propiedades de hemostasia; y los láseres de baja intensidad ó conocidos también como terapéuticos, con propiedades analgésicas, antiinflamatorias y de bioestimulación.⁴

En la actualidad están en constante investigación los beneficios del láser de baja intensidad, como alternativa terapéutica no invasiva que busca demostrar su bioestimulación celular, aumentando o disminuyendo las funciones celulares en diferentes estructuras anatómicas.² Asimismo, se continúa estudiando sus efectos analgésicos, anti-inflamatorios, inmunológicos, reparativos y/o regenerativos a nivel de los tejidos orales;^{2,5,6} y específicamente en este estudio, la estimulación a la osteogénesis logrando la aceleración de la cicatrización ósea de los alveolos dentales.

Es por ello que el propósito de la presente investigación fue comparar mediante histomorfometría ósea la densidad de la neoformación ósea del alveolo dental tratado en mandíbula de ratas Holtzman con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

En la práctica clínica se observan pacientes buscando tratamientos con resultados óptimos con el mayor confort y el mínimo de secuelas durante y/o post-tratamiento; siendo la extracción dental una situación clínica frecuente que requiere de 4 a 6 meses de cicatrización, lo que significa un problema terapéutico para los pacientes que desean su tratamiento de manera inmediata o a corto plazo.

A través del tiempo se han realizado diversos estudios buscando alternativas de tratamiento, encontrándose una diversidad de materiales para este fin; empero, diversos factores generan desventajas en el tiempo post operatorio para que el paciente pueda obtener los resultados esperados. Hasta la fecha, solo se han tratado de mejorar dichos materiales; sin embargo, existen pocas investigaciones dirigidas a desarrollar nuevas alternativas de tratamiento con el fin de acelerar la cicatrización de los alveolos dentales.

El uso del láser de baja intensidad y su mecanismo de acción en el tejido vivo no se conoce completamente. La energía emitida por el láser es absorbida por los cromatóforos intracelulares para convertirlos en energía metabólica, actuando como un factor inductor para el aumento de la producción de matriz ósea, por el efecto antiinflamatorio y el incremento de la vascularización. Estas características pueden resultar en aumento de la liberación de factores como la microvascularización; lo que acelera la reparación del hueso.⁴⁻¹⁰

En la actualidad, solo se han tratado de mejorar biomateriales en estudios experimentales y clínicos en el contexto de la calidad y cantidad de regeneración ósea²⁶; sin embargo, la neoformación ósea en alveolos post-extracción con las aplicaciones del láser de baja intensidad no ha sido lo suficientemente evidenciado científicamente, por lo cual es de preocupación para el odontólogo general y el especialista considerarlo como una alternativa de tratamiento; es por ello, que en la presente investigación se comparó la densidad de la neoformación

ósea en alveolos dentales en mandíbula de ratas, con el fin de evaluar la cicatrización ósea tratados con y sin terapias de laser de baja intensidad.

III. MARCO TEÓRICO

El término “láser” se originó como un acrónimo de amplificación de luz por emisión estimulada de radiación, la cual es producida por un dispositivo o diodo emisor de luz (LED) que emite fotones en un haz coherente.^{4,8,10,11} Los láseres emiten radiaciones del espectro ultrarrojo, visibles, ultravioleta o de rayos X.¹¹

La terapia de láser de baja intensidad (TLBI) es el tratamiento mediante irradiación con luz de baja intensidad,¹¹ con una amplitud espectral estrecha en el rango infrarrojo o cercano a la luz visible (NIR) que varía entre los 600nm a 1000nm de longitud de onda.^{9,10,12} La TLBI, a diferencia de otros procedimientos, no utiliza un mecanismo térmico o ablativo, sino un efecto fotoquímico y fotodinámico con la finalidad de modificar el metabolismo celular, brindando reducción del dolor, mejores resultados inflamatorios y la bioestimulación celular.^{4,7,9,10,13}

Asimismo, esta radiación no ionizante no es invasiva y es muy bien tolerado por los diferentes tejidos, no produciendo efectos mutagénicos ni riesgos al receptor. Esta terapia puede ser aplicada en múltiples ocasiones, teniéndose efectos predominantemente analgésicos mediante la estimulación de la liberación de endorfinas e inhibición de las señales nociceptivas, efectos anti-inflamatorios tales como la reducción del edema tisular y la hiperemia vascular; y bioestimulantes que aumentan la microcirculación, como proliferación celular endotelial;⁷ y con ello lograr la cicatrización de heridas en menor tiempo de lo esperado.^{4,7,9,13}

La terapia de láser de baja intensidad tuvo sus inicios en el área de la salud en el año 1960 con la invención del láser rubí y en 1961 con el láser de helio-neón (HeNe).⁸ En el año 1962 se introdujo el LED, una fuente de luz semiconductor que emite luz roja de baja intensidad.⁸ Posteriormente, en el año 1964 se desarrolló el láser Nd:YAG, el primer láser para odontología, con una longitud de onda de 1064 nm, causando menos daño térmico en comparación al láser rubí.¹⁴ Luego el Dr. Endre Mester en el año 1967, en la Universidad de Medicina Semmelweis en Budapest, Hungría, realizó un estudio con el propósito de evaluar si el “rayo de luz” producía cáncer en ratones; sin embargo, al realizarlo se obtuvo

resultados inesperados. Este experimento consistió en afeitar la espalda de los ratones y realizar aplicaciones de láser rubi de baja intensidad (964 nm) al grupo experimental, obteniendo en este grupo el crecimiento del pelo en menor tiempo comparado con el grupo control, sin observarse desarrollo de cáncer.^{7,8,9}

Con el transcurrir de los años, los diversos estudios realizados con los láseres, demostraron que si es insuficiente la radiación y/o el tiempo, entonces no se obtendrá respuesta. Asimismo, si al menos una de estas es demasiado alta o larga, entonces la respuesta será inhibida.⁸ Esta respuesta es conocida como bifásica descrita por Hugo Schulz en el año 1887, quien publicó un documento que muestra varios venenos a dosis bajas que producen un efecto estimulante.^{1,8,9} Posteriormente, entró en contacto con el psiquiatra R. Arndt y juntos desarrollaron un principio que más tarde se conoció como la “Ley de Arndt-Schulz”, afirmando que una débil dosis de estímulos acelera ligeramente la actividad y viceversa, estímulos mas fuertes pueden elevarlas aún más, pero si alcanza el pico, finalmente se logra una respuesta negativa.^{8,9}

En base a los hallazgos iniciales de Schulz, en 1896 Ferdinand Hueppe, mostró la inhibición de la estimulación bacteriana a altas/bajas dosis por agentes tóxicos, el cual es conocido como la Regla de Hueppe. Hoy en día, este principio se le denominó como “hormesis” acuñado por primera vez en 1941 y la primera referencia en 1943, que posteriormente ha sido discutido varias veces en la investigación de la TLBI.⁸

El dispositivo láser consiste en sustancias líquidas, sólidas o de gas, que al excitarse por una fuente de energía produce un haz de luz.⁴ Existen diversas clasificaciones de láseres; sin embargo, las más utilizadas en el área de la salud se dividen en dos categorías: los láseres de alta intensidad o quirúrgicos y los láseres de baja intensidad o terapéuticos.⁴ Los láseres terapéuticos utilizan bajos niveles de luz roja e infrarroja cercano a la luz visible, y se caracterizan por su baja densidad de energía frente a otras formas de terapia de láser que producen ablación, corte y coagulación térmica.⁴ Asimismo, este tipo de láser es clasificado sanitariamente como Clase III; y se utiliza para tratamientos de lesiones de tejidos blandos y duros.^{4,6,8}

Para lograr que la luz penetre eficazmente en los tejidos, se requiere de cromóforos responsables del color, que se encuentran en los tejidos bucales (melanina, hemoglobina y oxihemoglobina)^{8,12,15} que poseen bandas de alta absorción a longitudes de onda menores de 600nm.⁸ Es por ello que para tratar el tejido superficial se necesita longitudes de onda en el rango de 600 a 700nm; y para tejidos más profundos, longitudes más largas en el rango de 780 a 950nm; habiéndose descartado las longitudes de onda en el rango de 700 a 770nm para el tratamiento en los tejidos, debido a que se ha encontrado limitación en la actividad bioquímica, y por lo tanto, ya no se utilizan.⁸

Existen diversos sistemas de láser de baja intensidad; siendo los más comerciales el Helio-Neón (HeNe) que emiten longitudes de onda de 632,8nm, helio-neón-arseniato (He-Ne-As) con longitud de onda entre los 780-870nm, Galium-aluminio (GaAl) entre los 630-685 nm, Oxido de itrio aluminio dopado con Neodimio (Nd:Y₃Al₅O₁₂ - Nd:YAG) que emite una longitud de onda de 1064 nm, galio-arseniato (Ga-As) con una longitud de 904 nm y láseres de diodo Galium-aluminio-arseniuro (GaAlAs) con una longitud de onda aproximadamente de 780-830nm;^{4-6,12,14} así como LED con una banda de emisión entre los 670 a los 950nm.¹² Estos LEDs emiten una irradiancia comúnmente de 5mW/cm² a 5 W/cm², generando con poca potencia hasta 10W pulsada, o en algunas ocasiones continua con 1mW.^{7,8}

La TLBI ha demostrado efectos analgésicos, antiinflamatorios y de bioestimulación de la fototerapia; sin embargo, para que este tratamiento sea eficaz depende de parámetros de irradiación del sistema láser tales como longitud de onda, potencia, densidad de energía y tiempo de exposición. El momento de la aplicación y la radiación repetida durante un cierto período debe ser seleccionado según cada tratamiento; así como la combinación correcta de los parámetros para lograr los efectos deseados.^{4,7,8,14,15} Una inadecuada elección de estos parámetros puede dar como resultado una efectividad reducida, o incluso un resultado terapéutico negativo.^{8,14}

En los principios fotobiológicos se demuestra que el espectro de luz visible no pasa a través de la mano; sin embargo, el rojo lejano y el infrarrojo cercano en el

rango de 660 a 900nm penetran muy bien, con dos picos entre los 725nm y 810nm. Es por ello, que la mayoría de los dispositivos TLBI utilizados en odontología están dentro del rango de 600-1000 nm.^{7,9} Esta información es relevante para el investigador para la elección de la longitud de onda; no obstante, no existe una longitud de onda óptima que sea universalmente aceptada.⁷

Cabe recalcar que para la penetración tisular eficaz de la luz, se debe tomar en consideración los fotoreceptores del huésped, tales como la hemoglobina y la melanina; pues no es bien absorbido por los tejidos duros, en el cual provoca un efecto de fusión y recristalización como en el caso de la dentina.¹⁴ Es por ello que se recomienda seleccionar una longitud de onda bien definida según los fotoreceptores, siendo los más estudiados los derivados de hematoporfirina (620-650 nm), cianina (600-805 nm), fenotiazina (620-700 nm), agentes fitoterápicos (550-700 nm), ftalocianinas (660-700 nm), derivados de xanteno, acridinas, cloro y merocianinas. La fenotiazina tiene una mayor absorción entre 620-660 nm, por lo tanto, son útiles en la TLBI debido a su penetración eficiente y a su producción suficiente de oxígeno.¹⁴ Es así que la penetración tisular eficaz de la luz y la longitud de onda específica absorbida por los fotoreceptores son dos principales parámetros a considerar en la TLBI.¹⁰

Con respecto a la dosis de energía (J) y densidad de energía (fluencia) (W / cm^2) son con frecuencia referido incorrectamente como “dosis”. Ambos son cálculos distintos, en el cual, la dosis de energía depende del tiempo (segundos) empleado y de la potencia (W) de emisión utilizada, a diferencia de la densidad de energía que es obtenida del resultado de la potencia (W) entre el área del haz del láser (cm^2), o también obtenida por la Energía (J) empleada sobre dicha área (cm^2). Asimismo, el término radiométrico correcto es la irradiancia.⁷ La potencia que se utiliza con frecuencia está en el intervalo de 1-1000 mW y varía ampliamente dependiendo de la aplicación particular.⁸

En la clínica se asume que el láser emite una irradiancia uniforme y de forma gaussiana (distribución normal); sin embargo, si la punta del láser esta a mayor distancia de la lesión o el área a tratar, disminuye. A medida que la irradiancia sea más baja, o el tiempo de emisión sea más corto, probablemente no se encontrará

efecto significativo. Asimismo, si la irradiancia es demasiado alta, o el tiempo de tratamiento es demasiado largo, probablemente el beneficio se suprime o se producen efectos inhibitorios no deseados; incluso es posible que se induzca a algunas células a su división y a otros a su apoptosis.^{3,7,8,14}

Por otra parte, la medición que abarca el área del haz es de gran importancia para obtener el cálculo exacto de la irradiancia; empero, ha sido erróneamente interpretado por muchos investigadores, debido a que los rayos emitidos por los láseres diodos no son redondos (Distribución Gaussiana), y por ello es con frecuencia mal informado.⁷

Una respuesta eficaz en los tejidos depende de la irradiancia que se aplica y el tiempo de dicha aplicación. Además, la irradiancia en una primera etapa y la repetida en varias sesiones, podrían obtener distintas cantidades de eficacia.¹³ Asimismo, la óptima irradiancia y tiempo lograrían la estimulación esperada, y efectivamente mejorar el crecimiento celular sin perjudicar la síntesis de proteínas.^{8,14} Esta respuesta es a menudo comparado con la respuesta bifásica “Ley de Arndt-Schulz”, previamente mencionada.⁸ Es así que en la década de los 70’ con la curva dosis-respuesta bifásica de la TLBI, se demostró que más, no significa necesariamente mejor.¹⁰

Esta respuesta del tejido frente la irradiancia es conocida como la efectos de la TLBI o fotobiomodulación, que debido a la aplicación de luz en una zona, y solo por acción y estimulación directa de la luz, el sistema biológico vivo tiene algún efecto; lo que respalda que, para experimentos fotobiológicos debe producirse efectos fotoquímicos y posteriormente fotofísicos y/o fototerapéuticos.^{3,4,7} Es decir, la TLBI actúa mediante la inducción de una reacción fotoquímica en la célula, un proceso referido como la bioestimulación o fotobiomodulación; utilizando energía de luz láser para afectar la respuesta biológica de la célula.^{4,8,14,15}

La primera ley de la fotobiología sustenta que para que se obtenga algún efecto, esta debe ser absorbida por la fotoquímica que se produzca de las células huésped, independientemente del tiempo de irradiación.^{7,9} Los fotones emitidos deben ser

absorbidos por las bandas electrónicas pertenecientes a algunas moléculas fotoreceptores, o cromóforos.⁹ Por lo tanto, la TLBI no es un mecanismo térmico ni ablativo, sino más bien un efecto fotoquímico comparable a la fotosíntesis en las plantas, en la cual la luz es absorbida y ocurre un cambio químico.^{4,10}

El cromóforo es una molécula o parte de ella, que brinda el color y se presenta de dos formas: sistemas de electrones pi conjugados y complejos metálicos.⁹ Existen diversos cromóforos tales como la clorofila, hemoglobina, mioglobina, porfirinas, flavinas, flavoproteínas y citocromo c oxidasa (CCO); siendo los principales cromóforos del tejido, las hemoglobina y la melanina, los cuales tienen bandas de alta absorción a longitudes de onda más cortas.^{9,14}

Al aplicar la TLBI, la luz incide en el tejido biológico, gran parte de ella se absorbe, parte de ella es reflejada o dispersa, y finalmente, parte de ella se transmite.^{8,14} La luz en el tejido se absorbe y se dispersa mucho más alto en la región del espectro azul frente al rojo; asimismo, en animales y seres humanos, casi exclusivamente rojo e infrarrojo cercano a la luz (600-1100 nm), debido a que la hemoglobina no absorbe en esta región y la luz puede penetrar profundamente en los tejidos vivos.^{9,10,12} Además es importante conocer que los tejidos tienen propiedades ópticas que son de considerable importancia para responder al mecanismo de acción de la TLBI. Es así que la máxima penetración eficaz de la luz en el tejido se conoce como “ventana óptica” y se extiende aproximadamente entre los 650nm hasta los 1200nm.^{9,10}

La absorción de la luz en el tejido es el principal responsable de los efectos y respuestas celulares. Los fotones de la luz tienen estados de energía que son cuantificados; es por ello, que la absorción de un fotón ocurre sólo durante la diferencia de dichos estados de energía cuantificados. Por otra parte, la dispersión en el tejido es el primer paso en todo este proceso, en el cual, se determina la distribución del volumen de la intensidad de la luz sobre el tejido; además de estar acompañada por un cambio en la dirección de la propagación sin pérdida de energía, y por ello su gran importancia.¹⁴

El mecanismo de la TLBI aun no está bien establecido; sin embargo, esta absorción monocromática visible y cercana al infrarrojo al parecer tiene una amplia gama de efectos en los niveles moleculares, celulares y tisulares.⁸ La literatura describe dos teorías: la primera propone que la luz de una longitud de onda específica activa la cadena respiratoria mitocondrial de las células, y en la segunda que la luz actúa abriendo los canales de calcio en la membrana celular.^{6-8,10,12,14}

Basándonos en la primera teoría a nivel mitocondrial, ocurren reacciones fotoquímicas primarias, en las que en la primera ocurre la acción fotodinámica de sensibilizadores endógenos, tales como los cromóforos; la segunda respalda la fotorreactivación de superóxido dismutasa; y la tercera reacción demuestra la fotólisis de complejos de proteínas que contienen metal con el óxido nítrico que provoca la liberación de NO libre y reactivación de los portadores de la respiración.^{6-8,10,12,14}

Las mitocondrias al ser la fuente principal de energía de la célula (ATP), absorben la luz emitida pudiendo modular las reacciones bioquímicas celulares y estimular la respiración mitocondrial, a través de la producción de oxígeno molecular y la síntesis de ATP.⁸ La fotorecepción en la mitocondria no sólo intensifica el metabolismo respiratorio; sino también las propiedades electrofisiológicas de la membrana, promoviendo así cambios en la fisiología celular. Por otra parte, con el aumento en la síntesis de ATP se acelera la velocidad de la mitosis celular.⁴ Sin embargo, la influencia de la TLBI se extiende mucho más allá de aumentar la producción de ATPs. Parte del oxígeno presente se metaboliza produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), como un subproducto natural.^{7,10} Cada célula puede contener hasta miles de mitocondrias y en la mayoría de células de mamíferos, las mitocondrias son una fuente importante de ROS, que frente a su fosforilación oxidativa y modulación generan mayor producción de ATPs.^{8,10,15}

Químicamente las ROS son moléculas activas que juegan un papel importante en la señalización celular, la regulación de la progresión del ciclo celular, la activación de la enzima, y la síntesis del ácido nucleico y de las proteínas; que de manera reversible afecta las funciones en la mitocondria, el citosol y el núcleo.^{8,10}

ROS son pequeñas moléculas que incluyen iones de oxígeno tales como superóxido, radicales libres tales como el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, y peróxidos orgánicos. ROS son altamente reactivos con moléculas biológicas tales como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos insaturados. Además, las ROS están involucradas en las vías de señalización de la mitocondria al núcleo. Se cree que las células tienen sensores redox cuya función es detectar niveles potencialmente dañinos de ROS que pueden causar daño a las células, y luego inducir la expresión de las defensas anti-oxidantes, tales como superóxido dismutasa (Cu-Zn-SOD) y catalasa.¹⁰

Según la acción patógena de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se producen dos reacciones: formación de iones de hierro ferroso y la unión del óxido nítrico. La acción protectora del SOD se basa en la disminución en la concentración de radicales superóxido a causa de la dismutación; además de la seguida eliminación del peróxido de hidrógeno en las reacciones catalizadas por la glucosa peroxidasa y la catalasa. El exceso de $O_2^{\cdot-}$ es la primera causa de la acción patógena, en la cual, se libera hierro ferroso en forma de ion ferroso libre (Fe^{2+}) a partir de la penetración $O_2^{\cdot-}$ en la ferritina desde los diferentes depósitos de las células.¹²

La segunda causa de la acción patógena del superóxido es la unión del exceso de este radical al óxido nítrico. Las células endoteliales, sanguíneas, macrófagos tisulares, entre muchas otras células liberan radicales de superóxido y simultáneamente producen óxido nítrico. Ambas moléculas interactúan en forma activa formando aniones de peroxinitrito, para luego formar el radical hidroxilo. Los aniones de peroxinitrito tienen un efecto extremadamente citotóxico. Por ello, la importancia de la extracción de uno de estos componentes previo a la formación del peroxinitrito.¹²

El fenómeno de la fotoreactivación del superóxido dismutasa (Cu-Zn-SOD) fue descubierto en los estudios de la acción del láser de He-Ne en la cicatrización de heridas. Probablemente, se asocia parcialmente con la intensificación de la protección antirradical en el área de la herida. La adición del superóxido dismutasa (SOD) en el exudado elimina los radicales superóxido; así como la

adición de catalasa elimina los radicales del peróxido de hidrógeno. Se esperaría que la actividad de la catalasa o superóxido dismutasa en el exudado reduzca inicialmente los radicales, bajo algunas condiciones y radiación láser reactivado. Como resultado, la concentración del superóxido estacionario disminuye en las células y tejidos en los que este radical se forma constantemente, en especial bajo condiciones patológicas.¹²

Dentro de la influencia de la TLBI se produce una serie de cambios citosólicos, los cuales, inducen a la expresión de factores de transcripción regulados.^{8,10} Estos cambios actúan a través de intermediarios como el monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y la proteína quinasa D (PKD) para activar factores de transcripción AP-1 y factor kappa B nuclear (NF-kB) que resulta en cambios en la expresión génica y la posterior síntesis de proteínas.³ Varios de los factores de transcripción están regulados por estos cambios en el estado redox celular, pero el más importante es el NF-kB.^{8,10} Además tenemos el factor activador redox-1 (Ref-1) dependiente de la proteína-1 (AP-1), factor nuclear kappa B (NF-kB), p53, la activación de factor de transcripción / cAMP-elemento respuesta - proteínas de unión (ATF / CREB), factor inducible por hipoxia (HIF-1), y HIF- como factor. Es así que estos factores de transcripción inducen a la síntesis de proteínas que desencadenan efectos adicionales, tales como aumento de la proliferación celular y la migración, la modulación de los niveles de citoquinas, factores de crecimiento y mediadores inflamatorios, y aumento de la oxigenación de los tejidos.⁸

Por otra parte, las mitocondrias no sólo son fuente principal de ATPs y de ROS, sino que también sintetizan óxido nítrico (mtNO) frente a tejidos estresados, hipóxicos o isquémicos. Este mtNO compite constantemente para desplazar el oxígeno de la unión al citocromo c oxidasa (CCO) en la cadena de transporte de electrones, el cual, es una enzima fundamental para la producción de energía. Es por ello, que al aumento de las concentraciones del mtNO puede inhibir la respiración celular; además de reducir la síntesis de ATP y aumentar el estrés oxidativo, que conduce a la inflamación.^{7,9,12}

Con respecto a lo previamente mencionado, se ha propuesto que la TLBI podría funcionar debido a la fotólisis y/o fotodisociación de mtNO a partir de CCO, invirtiendo así la inhibición mitocondrial de respiración debido a la excesiva unión de mtNO.⁹ Asimismo, la fotodisociación de NO ocurre a partir de sus sitios de unión en el hemo-hierro y centros de cobre donde competitivamente inhibe la unión de oxígeno y reduce la actividad enzimática necesaria, lo que permite una afluencia inmediata de oxígeno y la reanudación de la respiración y la generación de especies reactivas del oxígeno.^{9,12}

Es posible que la baja irradiancia de luz roja / NIR produce una pequeña cantidad de NO a partir de las mitocondrias por disociación de los almacenes intracelulares (como los nitrosotioles, NO ligado a hemoglobina o mioglobina, o disociación de NO del CCO). Un segundo mecanismo para la producción de NO es el aumento mediado por luz de la actividad de nitrito reductasa del citocromo c oxidasa. Y una tercera posibilidad es que la luz puede causar un incremento de la actividad de una isoforma de la sintasa de óxido nítrico, posiblemente por el aumento de los niveles de calcio intracelulares. Se propone que esta baja concentración de NO producida por la iluminación sea beneficiosa a través de las vías de señalización celular.¹⁰

El complejo IV ó también conocido como el citocromo c oxidasa, es un gran complejo de proteína transmembrana, que consiste en dos centros de cobre y dos centros de hemo-hierro, el cual, es un componente de la cadena respiratoria de transporte de electrones.^{9,14} En el caso de los espectros de absorción obtenidos por el CCO en diferentes estados de oxidación demostraron ser muy similares a los espectros de acción para las respuestas biológicas a la luz. Por lo tanto, se propuso que el CCO es el fotoceptor primario para la gama de color rojo-NIR en células de mamíferos. Es por todo ello, que el cromóforo CCO o complejo IV es crucial en la respuesta celular a la TLBI.^{7-10,14}

Basándonos en la segunda teoría a nivel de la membrana celular, la acción de la peroxidación de lípidos en la capa de fosfolípidos de las membranas llevan a varios efectos principales; tales como: el aumento selectivo de la permeabilidad de los iones H⁺ y radical OH⁻; aumento de la permeabilidad a los iones Ca²⁺; y la

disminución de la estabilidad eléctrica lo que puede provocar una “auto-ruptura” de las membranas por su propio potencial eléctrico. Asimismo, se añade que en las membranas celulares, la oxidación de grupos SH y daños a la bomba de calcio (Ca^{2+} -ATPasa) que altera la permeabilidad de los canales para iones Ca^{2+} . Uno de los principales resultados de todos estos efectos es un aumento intracelular de la concentración Ca^{2+} como efecto de la TLBI.^{6,12}

Por las diversas reacciones previamente mencionadas se genera y almacena energía, lo cual, puede ser utilizado por el sistema para realizar diversas tareas celulares; y con ello provocar principalmente un aumento en productos mitocondriales como ATP, NADH, ARN, proteínas y aumento del consumo de oxígeno. Lo que lleva a la reducción de los mediadores inflamatorios, el aumento del metabolismo, la proliferación celular y la maduración, el aumento de la cantidad de tejido de granulación, induciendo al proceso de reparación.^{4-8,10,12}

La TLBI también mejora la proliferación, la maduración, y la motilidad de los fibroblastos, y aumenta la producción de factor de crecimiento de fibroblastos básico. Los linfocitos se activan y proliferan más rápidamente, y aumentan la maduración de las células epiteliales, permitiendo que las heridas se reparen con mayor rapidez. La capacidad de los macrófagos para actuar como fagocitos también se ha mejorado en virtud de la aplicación de la TLBI.^{4,8,13} Con ello aumenta la actividad fagocítica y quimiotáctica durante las primeras etapas de la reparación de tejidos (aproximadamente 6 horas después de una lesión), facilitando la limpieza de la herida y el establecimiento de las condiciones necesarias para la posterior fase proliferativa.⁴

A nivel del tejido óseo específicamente, estudios in vitro que utilizaron células osteoblásticas frente a la TLBI demostraron un aumento en la actividad mitocondrial, mayor síntesis del ADN y ARN de los osteoblastos, formación de nódulos óseos, expresión del gen de osteopontina y osteocalcina, aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina; aumentando la proliferación y diferenciación de osteoblastos, equilibra la producción y diferenciación de fibroblastos, inhibición de la secreción de algunos mediadores químicos de la inflamación; y aumenta la circulación de la sangre periférica.^{2,3,4,5,13} Con ello aumenta el potencial para la

remodelación y la reparación ósea.^{3,4} Estudios histopatológicos realizados en animales que recibieron TLBI (GaAs, GaAlAs), con fracturas óseas o expansión rápida maxilar revelaron aumento de fibroblastos y tejido osteoide; logrando una rápida osificación y aumento de la densidad mineral ósea en comparación con el grupo control (sin TLBI).^{5,6,8}

A nivel vascular, la TLBI estimula la proliferación de las células endoteliales, el cual permite la formación de mayor cantidad de vasos sanguíneos y producción de tejido de granulación. Es así que se estimula la relajación del músculo liso vascular y por ello contribuye a los efectos analgésicos.⁴

Los efectos de la TLBI permiten el alivio del dolor; mejora los trastornos articulares crónicos; aumento de densidad ósea en fracturas, expansiones y defectos; actividad antimicrobiana (*Prevotella* sp.y *Fusobacterium* sp.); disminución del edema, eczema y dermatitis; entre otras aplicaciones con resultados favorables.^{2,4,8,12,14,15} Asimismo, se han realizado estudios de la TLBI incorporada a la terapia periodontal no quirúrgica, mejorando significativamente el índice del sangrado al sondaje (SBI), nivel clínico de inserción, y los niveles de la profundidad de sondaje (PD) en comparación con el grupo de control.¹⁴ Sin embargo, la aceleración en la cicatrización de alvéolos post extracción dental aun está en constante investigación, siendo una situación clínica muy frecuente. Es así que en la actualidad se busca demostrar su bioestimulación y aceleración en la neoformación ósea, además de estimular la síntesis de colágeno, que es el principal responsable de la matriz osteoide.

Las diferentes situaciones que se presentan en la consulta odontológica pueden hacer necesaria la extracción dental; caries avanzadas, traumatismos, lesiones endodónticas, defectos del desarrollo o periodontitis avanzadas; para lo cual, se debe tener en cuenta que la extracción dental debe ser lo menos agresiva posible, ya que tras realizar la exodoncia, se produce una reabsorción ósea dando lugar a una atrofia de la cresta alveolar y a un colapso de los tejidos blandos.¹⁶ Es por ello, con el objetivo de reducir los cambios dimensionales verticales y horizontales del alveolo tras la extracción dentaria, esta debe ser lo más atraumática posible, respetando en todo momento los tejidos blandos adyacentes,

especialmente el periostio. Además, se debe cortar las fibras del ligamento periodontal mediante un bisturí o periostotómo afilado y en el caso de dientes multirradicales, especialmente cuando estos presentan raíces divergentes, se realizará la radículo sección para facilitar la salida del diente y evitar fracturas indeseables tanto de las raíces como de las tablas óseas.^{16,17,18}

Al extraer un diente se inicia una sucesión de procesos dentro del alvéolo que cicatrizará por completo de unos 4 a 6 meses.¹⁹⁻²² Es así que, inmediatamente después de la extracción del diente, el alveolo se llena de sangre formando un coágulo, el cual se sustituye por tejido de granulación dentro de una semana. En la curación de la herida, las células epiteliales migran por debajo y se protegen por el coágulo de sangre; en cambio en la curación del alveolo dental, el epitelio migra sobre el tejido de granulación para cubrir la curación. Esto sucede porque este tejido inflamatorio es reconocido como tejido conectivo por las células epiteliales.²⁰

El tratamiento para la cicatrización de heridas es un proceso complejo, el cual requiere de acciones celulares y biológicas como proliferación celular, diferenciación, síntesis y liberación de citoquinas, factores de crecimiento y otras proteínas. Asimismo, para la cicatrización de los alvéolos dentales incluye formación y maduración del coágulo sanguíneo, infiltración de fibroblastos para sustituir al coágulo, y establecer una matriz óptica que posteriormente se reemplazara con neoformación ósea y finalmente, hueso laminar y médula ósea.¹⁶

El proceso de reparación constituye una reacción tisular dinámica, que comprende diferentes fenómenos tales como la inflamación, la proliferación celular y la síntesis de elementos de la matriz extracelular, incluyendo el colágeno, elástica y fibras reticulares.⁴

La inflamación es la reacción de los tejidos vivos vasculares a una lesión local. Sirve para destruir, diluir o inmovilizar el agente agresor mediante la activación de una serie de procesos biológicos que reconstruyen el tejido dañado tanto como sea posible.⁴ En este proceso se estimula la liberación de sustancias como la histamina, la serotonina y la bradiquinina; induce la liberación local de citocinas,

quimiocinas y otros modificadores de la respuesta biológica; además de activar la producción de ácido araquidónico y la conversión de las prostaglandinas en la prostaciclina, en la que está intrínsecamente relacionado con el proceso de reparación, que se inicia durante las primeras etapas de la influencia del agente agresor.^{4,5,8}

Araújo y Lindhe²² en el 2005 realizaron un estudio en 12 perros de 1 año de edad de 10 kilogramos de peso, en los cuales evaluaron los cambios y alteraciones dimensionales del alveolo después de la extracción del diente, así como los procesos de modelado y remodelación asociado con dicho cambio. Se realizó las extracciones dentales de los cuatros premolares de ambas hemiarquadas mandibulares, realizándose la evaluación histológica a las 1, 2, 4 y 8 semanas posteriores a las extracciones; observándose lo siguiente:

Primera Semana:

- La curación de la mucosa que recubría el sitio de la extracción mostró signos de inflamación. Estas áreas podían ser identificadas como un contenido pobre de colágeno, pero rico en estructuras vasculares y de células de inflamación.
- La parte interna del alveolo post-extracción fue ocupada por coágulo, tejido de granulación, la matriz provisional y pequeñas cantidades de nueva formación hueso.

Segunda Semana

- La mucosa del sitio de la extracción carecía de células inflamatorias; sin embargo, si se incluyó un tejido conectivo rico en fibroblastos. Las porciones exteriores de la región crestal de ambas paredes óseas estaban cubiertas con osteoclastos, observándose también que varios osteoclastos se encontraron en la superficie externa de las paredes de hueso bucal y lingual, apical de la región crestal.
- Gran cantidad de neoformación ocurrió en porciones apicales y laterales del alveolo. Tejido de la matriz provisional residía en compartimentos centrales y marginales del sitio experimental.

Cuarta Semana

- En la región crestal de las paredes óseas, no se pudo encontrar hueso; además, en la región crestal de la pared bucal, una gran parte del hueso laminar aparentemente había sido reemplazado con tejido óseo. La pared ósea lingual fue en este intervalo entre 1,3 +/- 0,1 mm y 1,6 +/- 0.1mm de ancho. Las dimensiones correspondientes a la pared bucal eran 0.7+/- 0.2mm y 1.1+/- 0,2 mm, respectivamente.
- Se observó tejido de la matriz provisional en las partes más céntricas de la toma. El tejido mineralizado y el hueso ocuparon los segmentos restantes del sitio. La porción de tejido mineralizado se compone principalmente de tejido óseo, que parecía estar en el proceso tanto de modelado y remodelación.

Octava Semana

- La pared ósea lingual fue también, en este intervalo, considerablemente más ancha que la pared vestibular. Además, la cresta del hueso vestibular se encuentra a 2 mm apical a la cresta de la pared lingual. Se encontraron numerosos osteoclastos tanto en la superficie exterior de la cresta, y en más regiones óseas apicales del bucal.
- Osteoclastos dispersos fueron encontrados en los lugares correspondientes de la pared ósea lingual.
- La parte interna de la región alveolar fue ocupada por médula ósea; pero, incluía pocas trabéculas de tejido mineralizado que estaban compuestos por tejido óseo y hueso laminar.

Entre los avances de alternativas de tratamientos para la aceleración de la neoformación ósea, contamos con la versatilidad del láser y sus aplicaciones. En el área de la odontología, han surgido diversos informes sobre efectos positivos de la TLBI en la reducción del dolor, en la reducción de la inflamación, en el tratamiento de la mucositis, en la reparación frente a daños en los nervios después de la extracción del tercer molar, y parálisis después de la cirugía de la mandíbula.^{2-5,13} Asimismo, estudios realizados a nivel óseo con efectos positivos se encontraron que la TLBI contribuye a la osteogénesis del hueso palatino durante y después de la expansión maxilar;^{5,13} sin embargo, estudios con efectos

no significativos se encontraron en análisis microbiológico en pacientes con periodontitis moderada y en fijación del implante.^{23,24}

Fávaro-Pípi *et al.* (2010) investigaron y compararon los efectos de la baja intensidad de ultrasonido (LIPUS) y la terapia con láser de baja intensidad durante el proceso de curación del hueso por medio de análisis histopatológico e histomorfométrico. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos de 30 animales cada uno: el grupo de control (defecto óseo sin tratamiento); el grupo tratado con láser: (defecto óseo tratado con láser), y el (defecto óseo LIPUS tratados con ultrasonido); asimismo, dividiéndose cada grupo en tres subgrupos (n = 10) y en los días 7, 13 y 25 después de la lesión. Las ratas fueron tratadas con un 30 mW / cm² de baja intensidad ultrasonido pulsado y un láser de 830 nm a 50 J / cm²; obteniéndose buen porcentaje de neoformación ósea rodeado por tejido conectivo altamente vascularizado que presenta una ligera actividad osteogénica, con ser la deposición de hueso primario observada en el grupo expuesto a láser en el intermediario (13 días) y las últimas etapas de la reparación (25 días). Finalmente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el análisis histológico e histomorfométrico del grupo experimental con el control; sin embargo, no se observaron diferencias notables en las muestras tratadas con ultrasonido, principalmente en las últimas etapas de la recuperación.²

Mozzati *et al.*²⁵ en el 2012 publicaron el efecto de la terapia láser en proceso de curación alveolar en pacientes en espera para el trasplante de hígado, se evaluó inflamación, osteogénesis, y los parámetros clínicos. Doce pacientes con insuficiencia hepática de espera para un trasplante de hígado, con indicaciones a la extracción bilateral, entraron en el estudio de boca dividida. Un defecto post-extractivo fue tratado con láser, mientras que la otra se dejó sin tratamiento. Las muestras de los tejidos blandos eran retirados de alrededor del diente antes de la extracción y después de 7 días. La irradiación con láser super pulsado impidió IL-1 β aumento e inducida por IL-6, IL-10, y el colágeno III aumento a los 7 días en comparación a su nivel antes de la extracción, mientras que los otros parámetros fueron sin modificar. Además, la regeneración epitelial mostró un resultado positivo de la terapia con láser, y los pacientes informaron de menos

dolor en el sitio tratado con láser. Concluyendo, que la terapia con láser parece ser el tratamiento de elección para los pacientes debido a su eficacia clínica, la seguridad, la buena tolerancia, y su capacidad para prevenir la inflamación.

Korany *et al.* ²⁶ en el 2012 evaluaron el efecto de la terapia con láser de baja intensidad en el grado de reparación ósea en los defectos de 30 ratas macho albinas suizas irradiadas, con un peso aproximado de 120 a 150 g. Los animales fueron sometidos 6 radiaciones por el dispositivo (GaAIAs) láser de diodo. Tres días después de la irradiación, se extrajeron las primeras molares inferiores bilaterales, los cuales fueron irradiados inmediatamente después de la extracción de los lados izquierdos, mientras que las tomas de la derecha no fueron expuestas al láser y sirvieron como control. Las ratas fueron asignadas al azar en tres grupos (10 ratas cada uno) de acuerdo con la fecha de sacrificio, 3, 7 y 10 días en los grupos I, II y III, respectivamente. Cada grupo se subdividió en los subgrupos A y B (10 muestras cada uno), donde A representa el lado derecho de la mandíbula y B representa el lado izquierdo. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina y eosina, tricómico de Masson. Se obtuvo que la TLBI aceleró la curación del hueso, mientras que, la radioterapia retrasó la cicatrización ósea inducida a lo largo de los tres grupos experimentales. Asimismo, en el análisis histomorfométrico reveló un aumento en el porcentaje de área de hueso trabecular en los defectos con láser en comparación con los de control en el grupo II, siendo estadísticamente significativa ($p = 0,0274$). Además el aumento en el porcentaje de área de las trabéculas del hueso entre los defectos con láser y el control del grupo III fue estadísticamente insignificante ($p = 0,1903$), concluyendo que en una aplicación modelo de rata de la TLBI con un dispositivo láser de diodos GaAIAs puede mejorar la curación del hueso y mineralización en los zócalos sometidos a radiación gamma.

El-Maghrabyn *et al.* ⁶ en el 2013 evaluaron los efectos de bioestimulación y regenerativos de la TLBI con radiaciones gamma en mandíbula de cuarenta y ocho ratas albinas machos ratas. La muestra fue dividida en dos grupos: grupo 1, en la que el lado izquierdo de la mandíbula fue sometido a tres sesiones sucesivas de láser (cadencia) antes de la radiación gamma de todo el cuerpo (2Gy / 3

fracciones/semana); y grupo 2, recibió la radiación gamma de todo el cuerpo (2 Gy / 3 fracciones / semana) antes de tres sesiones sucesivas de láser aplicadas a lado izquierdo, siendo el lado derecho de ambos grupos como grupo control “no laser”. Asimismo, cada grupo se subdividió en cuatro subgrupos iguales (a, b, c, d) de acuerdo con el momento de la sacrificación (3, 7, 14, 21 días, respectivamente); posteriormente fueron sometidas al análisis histológico, histomorfométrico y de microscopía electrónica de barrido; obteniendo en el grupo control trabéculas óseas delgadas, irregulares y espacios medulares ensanchados. Los lados con aplicaciones de laser en los grupos 1 y 2 demostraron trabéculas óseas regulares, gruesos y continuos. Microscópicamente, las fibras de colágeno del grupo control aparecieron dispuestas irregularmente y más espaciadas en comparación con los grupos 1 y 2. Además, se observaron lagunas osteocíticas de tamaño normal en los grupos de láser, en comparación con los amplios espacios lagunares en el grupo control. El análisis histomorfométrico mostró un aumento significativo en el área de trabéculas óseas, así como la anchura de hueso compacto, para los grupos de láser, demostrando aparentemente que las aplicaciones de láser de baja intensidad atenúan los daños relacionados con la radiación en los huesos alveolares.

JUSTIFICACIÓN

En el terreno de la Periodoncia, Implantología, Cirugía Oral y Maxilofacial a menudo nos encontramos con pacientes que requieren extracciones dentales provocadas por diferentes causas, siendo un reto terapéutico acelerar la cicatrización del alveolo dental.

Existen en el mercado gran cantidad de biomateriales con el fin de mejorar la calidad y cantidad de la neoformación ósea, pero es claro que estos materiales disponibles no son iguales en términos de su efecto biológico, respuesta del huésped y resultados clínicos; además de los precios altos para los tratamientos que los requieren; siendo complicado de manejar económicamente por los pacientes o inaccesible para otros. Es por ello, la importancia de realizar más investigaciones en cuanto a nuevas alternativas de tratamientos.

Asimismo, el nivel en tecnología y el equipamiento en los diferentes hospitales del Perú han mejorado a través de los años; por lo cual, conocer y manejar nuevas alternativas de tratamiento para mejorar la calidad de atención de los pacientes es de gran importancia, para desarrollarnos y mantenernos constantemente actualizados en el ámbito de la salud general y salud oral.

La presente investigación tiene justificación teórico – científica porque permite establecer histomorfométricamente los beneficios que se obtienen con las aplicaciones de láser de baja intensidad para la aceleración en la cicatrización y neoformación ósea. Asimismo, tiene importancia clínica porque permite desarrollar nuevos protocolos de tratamiento con una mayor neoformación, en menor tiempo y de fácil manejo. Finalmente, tiene una importancia social, puesto que permite un mayor acceso de los pacientes a tratamientos de calidad debido que las aplicaciones de láser no requieren de ningún material adicional para su acción; y por ello es una alternativa económica.

La investigación es un aporte al conocimiento científico, porque determina si las aplicaciones del láser de baja intensidad tienen excelentes resultados en la neoformación del tejido óseo en los alvéolos post-extracción. Además, estas

aplicaciones permiten mayor accesibilidad a los pacientes debido a su bajo costo y tratamientos quirúrgicos poco traumáticos, para la realización de mejores y modernos tratamientos dentales que garanticen un adecuado resultado estético y funcional.

Por tal motivo, esta investigación fue de suma importancia pues con ello se pudo demostrar los mayores beneficios del láser de baja intensidad y sus futuras aplicaciones en nuestra práctica clínica. Además, de brindar nuevos conocimientos para el profesional de salud de su importancia y beneficios para la neoformación y reparación de los tejidos. Es por ello, que el propósito de la presente investigación fue comparar la neoformación ósea en alveolos dentales tratados con y sin aplicaciones del láser de baja intensidad; utilizando histomorfometría ósea, en mandíbula de ratas Holtzman.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivos

IV.1.1 Objetivo General

Evaluar la neoformación ósea en los alveolos tratados con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad utilizando la histomorfometría ósea, en mandíbula de ratas.

IV.1.2 Objetivos Específicos

1. Comparar la densidad de la neoformación ósea en los alveolos sin aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando la histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.
2. Comparar la densidad de la neoformación ósea en los alveolos con aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando la histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.
3. Comparar la densidad de la neoformación ósea en los alveolos con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando la histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.

V. HIPÓTESIS

- La densidad de la neoformación ósea en los alveolos con aplicaciones de láser de baja intensidad es mayor a la neoformación obtenida por los alveolos sin aplicaciones de láser.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Diseño de estudio

Experimental tipo ensayo de laboratorio.

Experimental, Prospectivo, Longitudinal, Comparativo

VI.2 Muestra

Se utilizaron 20 ratas machos albinas Holtzman. El cálculo para el tamaño de la muestra es un número arbitrario de casos basado en el principio de las tres “R”²⁷⁻³²; es por ello que para la ejecución de la investigación se determinó considerando la mínima cantidad posible de casos con resultados estadísticos descrito en el capítulo de “*Diseño de la investigación y las consideraciones bioestadística en la investigación pre-clínica*” en la *Guía de osteología en regeneración bucal y maxilofacial*³⁰; en la cual se emplearon 20 defectos en ratas machos albinas para cada grupo, teniendo 10 defectos por subgrupo de 7 y 14 días.

Por lo antes mencionado se utilizó 40 alvéolos dentales de ratas machos albinas Holtzman; debido a que se trabajó con dos alvéolos dentales por cada rata, una hemiarcada el control y la otra hemiarcada el experimental, empleándose 20 ratas en total.

VI.3.1 Criterios de selección

- Ratas machos albinas Holtzman.
- Ratas en buen estado de salud, sin alteraciones físicas al examen clínico.
- Ratas con edades comprendidas entre 2 y 2 1/2 meses.
- Ratas de 250-300g de peso vivo.
- Ratas que cumplan con los requisitos zoo-sanitarios del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) del Perú.
- Certificado Sanitario emitido por la INS por la cantidad de la muestra, que respalde los criterios de selección previamente mencionados.

VI.3 Operacionalización de Variables

a. Variable Independiente:

Terapia de láser de baja intensidad

Definición Conceptual: Medida terapéutica alternativa para acelerar la cicatrización y la reparación de tejidos. Definición operacional: Medida terapéutica con aplicaciones de láser de baja intensidad. Tipo Cualitativo, Dicotómica. Dimensiones o Categorías: Con láser de baja intensidad, Sin láser de baja intensidad. Indicadores: Aplicaciones de láser de baja intensidad a nivel de los alveolos. Valor: Presencia o ausencia. Medida en escala nominal. (Ver Anexo 01)

b. Variable Dependiente:

Densidad de la Neoformación ósea

Definición Conceptual: Área trabecular total que corresponde al tejido óseo neoformado en el alveolo. Tipo Cuantitativa, de razón. Indicadores: Conteo de cruces dentro de las trabéculas óseas neoformadas en el alveolo. Valor: Porcentual. Medida en escala de razón. (Ver Anexo 01)

c. Covariable: Períodos de Observación

Definición Conceptual: Período comprendido entre la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha del sacrificio. Tipo Cualitativa, Dicotómica. Indicadores: Cantidad de días entre la fecha de la intervención quirúrgica hasta la fecha del sacrificio. Medida en escala de ordinal. Valores: 7 y 14 días. (Ver Anexo 01)

VI.4 Procedimientos y/o Técnicas

El presente proyecto de investigación fue aprobado por el comité de ética institucional; siendo, capacitado y calibrado el investigador en los procedimientos a realizar para posteriormente el piloto y la ejecución del mismo. (Ver Anexo 08)

Para la técnica de Histomorfometría Ósea se realizó una calibración con un especialista en el área; la cual se valoró mediante el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI); los valores obtenidos en el CCI Intra Sujetos y el CCI Entre Sujetos fue de 0,972 y 0,934, respectivamente. Es con ello que se confirmó la calibración según la escala de valoración de la concordancia con una fuerza de concordancia de “*Muy Buena*” en ambos casos.

Prueba Piloto

Se realizó una prueba piloto para determinar la viabilidad del análisis histomorfométrico y evaluar los periodos de observación de las variables. Para ello se utilizaron 06 ratas *Holtzman* macho albinas, basándonos en el 10% del artículo base²⁶. Se seleccionaron como espécimen las ratas debido a lo recomendado por la Guía de Osteología con modelos pre-clínicos en experimentación en animales³⁰; siendo este modelo el ideal en estudios para evaluar reparación y regeneración ósea en defectos y alveolos dentales en animales de menor filogenia.

Todos los especímenes se obtuvieron del Instituto Nacional de Salud (INS) en Chorrillos, pertenecientes a la misma camada, machos de 2 a 2 ½ meses de aproximadamente 250 a 300 gramos de peso vivo; seleccionándose de esta edad y peso por el grado de madurez ósea obtenida, las cuales, son ideales para evaluar los procesos de neoformación ósea.²⁷⁻³³ Asimismo, los estudios ampliamente

realizados utilizan la cepa de ratas albinas *Sprague-Dawley* o también conocidas en español como *Holtzman*, para fines experimentales debido a que son dóciles y fáciles de manipular; es por ello, que se seleccionó dicha cepa para este estudio.³⁴

Por la variabilidad en número de raíces entre hemiarquadas y entre especímenes, se decidió evaluar la raíz distal, analizándose solamente la densidad y no la longitud de la neoformación ósea. Por otra parte, para la evaluación tomográfica considerada como un análisis adicional, no se obtuvo imágenes claras ni definidas, por el tamaño del espécimen, requiriéndose un micro-tomógrafo no disponible en el país; es por ello, que se descartó este análisis.

Para la selección de los periodos de observación, nos basamos según Korany²⁶ y El-Maghrabyn⁶ que utilizaron a los 3, 7, 10, 14 y 21 días. Sin embargo, en la prueba del piloto se realizó las aplicaciones de láser diariamente por 9 días, por ello los periodos de observación fueron posteriores a la terapia, seleccionándose los 15 y 30 días. Al análisis histomorfométrico se observó en el corte de tiempo de los 30 días una cicatrización de casi la totalidad del alveolo, no lográndose diferenciar el límite de hueso antiguo y el hueso neoformado, además de observarse histológicamente grandes espacios con hueso remodelado; por lo cual, para evitar sesgos en el análisis no se consideró este periodo de observación para la ejecución del estudio. A diferencia de los 15 días, que se observó presencia de trabéculas con hueso neoformado en más del 50% de los alveolos; además, se observó también una delimitación clara entre el hueso antiguo y el neoformado. Asimismo, se modificó el tiempo de aplicación; es por ello que se decidió evaluar en la ejecución a los 7 y 14 días.

Al observarse las láminas histológicas en el microscopio de luz multicabezal, se determinó el aumento a utilizarse en la ejecución para la toma de las microfotografías, y su posterior análisis cuantitativo.

El equipo del láser a utilizarse en el piloto fue el “Biolase” realizándose aplicaciones diarias de 1 minuto, siendo un equipo de fácil manejo y manipulación; empero, por los resultados obtenidos luego del análisis estadístico, se decidió cambiar de equipo con menor longitud de onda y diferente

dosificación. Además de seleccionar un equipo que se haya utilizado en otro estudio⁵, como el “Twinflex MMOptics”

Luego de evaluar y determinar todas las modificaciones en la metodología del estudio, se consideró los siguientes aspectos y procedimientos:

Adquisición de los animales

- La adquisición de las ratas cumplió con los requisitos zoo-sanitarios del SENASA del Perú; asimismo, cumplió con las exigencias de investigación biomédica.
- Además se certificó las condiciones de salud y calidad de la muestra en las cuales se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de la salida del lugar de origen.²⁷
- Finalmente, contó con un certificado de sanidad, que acreditó la calidad sanitaria de la muestra, producidos o adquiridos, mediante estudios adecuados que certifiquen la ausencia de enfermedades que puedan interferir con los resultados experimentales.(Ver Anexo 09)

Cuarentena de los Animales

- Los animales ingresaron quince días antes de la intervención quirúrgica al ambiente de experimentación de laboratorio de anatomía en la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para su aclimatación al nuevo ambiente, con los diversos factores controlados (Ver anexo 05); para lo cual, fueron colocados en jaulas individuales bajo condiciones ambientales de temperatura y régimen alimentario estándar.²⁷⁻³²
- Todas las ratas se mantuvieron con alimento específico para ratas y se administró agua de caño reposada *ad libitum* siguiendo el código de ética y bienestar animal, durante quince días antes del inicio del experimento.^{3,6,27,29-32}
- Se mantuvieron las condiciones de temperatura en 22 ± 2 ° C y la humedad estandarizada de 40-70%, controlados con un termómetro ambiental y un higrómetro, respectivamente. ^{27,30-33}

- Las jaulas prediseñadas fueron de policarbonato, por su facilidad de limpieza y desinfección, según el tamaño y el número de ratas (40cm² de área de la base y 13cm de altura). La desinfección se realizó tres veces por semana con detergente, esponja y agua, para luego desinfectar con hipoclorito de sodio al 5% en 10ml en una solución de 100ml de agua c.s.p.²⁷ Las jaulas fueron diseñadas únicamente para el estudio; desechándose al finalizar, por motivos de bioseguridad.
- Para el lecho o cama se utilizó viruta de madera esterilizada obtenida por el INS. El cambio de dicho material por jaula fue de tres veces por semana, con el objetivo de evitar la concentración del amoníaco.²⁷
- Finalmente, se suministró agua a demanda, realizándose la limpieza de los bebederos de policarbonato con detergente y esponja para los frascos, y un cepillo específico para el gotero; asimismo, su respectiva desinfección con hipoclorito de sodio sumergidos durante una hora.²⁷
- Se minimizaron ruidos e ingresos de luz. Además se contó con personal del ambiente de experimentación capacitado para un mejor refinamiento de los animales.
- Se monitoreó las funciones biológicas con registros de los animales participantes del estudio.

Manejo operatorio de los animales

Después del periodo de aclimatación, se inició todo el procedimiento anestésico a cargo de la medico-veterinaria con Maestría en Farmacología con mención en farmacología experimental, la cual cuenta con experiencia en el manejo de animales de experimentación. Los procedimientos quirúrgicos, los cuidados post-operatorios y el sacrificio de los animales fueron supervisados por los diferentes especialistas (médico veterinario, especialista en cirugía oral maxilo facial y un especialista en periodoncia, ambos con más de 10 años de experiencia en manejo de animales) condiciones de asepsia adecuadas.

Pre- Anestesia

Fueron preparados para la intervención quirúrgica respectiva, retirándose el agua y la comida 12 horas antes de la intervención.

Manejo farmacológico del espécimen

La anestesia general fue inducida por vía intramuscular según peso de Xilazin (Dormixil ®, 2-5 mg / kg, IP) y ketamina (Keta A 100 ®, a 40 mg / kg, IP). Se anestesió quirúrgicamente hasta llegar a un plano 2-3. El nivel de anestesia fue mantenido con la dosis de 1ml/kg de peso; para ello, se usaron jeringas de 1 ml con aguja de 26G. Dicho procedimiento fue realizado por el médico veterinario, quien cuenta con experiencia en el manejo de animales. (Ver Anexo 10, Figura 01)

Intervención Quirúrgica

Se realizó con el animal en decúbito dorsal sobre una mesa quirúrgica, con el campo quirúrgico delimitado por tallas estériles perforadas. Todo el instrumental utilizado en la intervención quirúrgica fue esterilizado previamente con calor seco. Asimismo, el sitio quirúrgico fue preparado para trabajar realizándose la exodoncia de la pieza dentaria en condiciones estériles

1. Asepsia y antisepsia Extraoral: Se realizó la asepsia y antisepsia con hisopos de madera previamente esterilizados, embebidos con solución de yodo polividona al 10% (ISODINE®). (Ver Anexo 10, Figura 02)
2. Asepsia y antisepsia intraoral: Se realizó con hisopos embebidos con Clorhexidina y Cloruro de Cetilpiridinio al 0,12% (Perio·Aid® Tratamiento, CHX 0.12% + CPC 0.05%) en el sitio quirúrgico.
3. Anestesia Local: Se colocó anestesia local con lidocaína 1.8 ml al 2% con epinefrina 1:80,000 (Xilocaína®). (Ver Anexo 11, Figura 03)
4. Extracción dental: Fueron extraídos en total para la muestra 40 primeros molares inferiores tanto del lado derecho como del izquierdo en el grupo tratado. Se realizó una exodoncia atraumática usando equipo de microcirugía y lentes de

aumento. Luego se realizó el curetaje con instrumental de microcirugía debido al tamaño del alveolo. Posteriormente, se realizó la compresión del alvéolo con hisopos embebidos de suero fisiológico refrigerado al 0,9% (NaCl 0,9%), con el fin de mantener el coágulo formado. (Ver Anexo 11: Figura 04, Anexo 12: Figura 05)

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en la sala de Anatomía de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se realizaron las intervenciones quirúrgicas durante un periodo de dos días; a cargo de dos especialistas capacitados con experiencia previa en estudios en animales. (Ver Anexo 12: Figura 06)

Manejo Pos-operatorio

Las ratas se colocaron en su jaula individual inmediatamente después de la intervención. Cada jaula tuvo registrado el grupo de estudio, la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha de sacrificio. Los animales se identificaron con códigos de cuatro dígitos de manera aleatoria por una persona ajena a la investigación. Se seleccionó al azar con el método de la moneda el lado a recibir terapia de láser de baja intensidad; y de esta manera, se registró dicha información por códigos con acceso únicamente del investigador principal.

1. Analgesia y antibioticoterapia: La analgesia se efectuó con clorhidrato de tramadol (Tramadol®) en dosis de 10mg/kg de peso administrado por vía oral, una gota en el agua del bebedero por tres días después de la intervención cada 24 horas. Se utilizó como antibiótico Baytril IM 1% (Enrofloxacin®), durante 3 días; usando jeringas de tuberculina de 1ml. con aguja 26G, cuya primera dosis se colocó al terminar la intervención quirúrgica. Ambos medicamentos fueron sugeridos por el médico veterinario como parte del protocolo en base a los antecedentes de otras investigaciones.

2. Controles: Todos los animales fueron controlados diariamente durante los primeros 5 días después de la cirugía para observar algún cambio de conducta; tales como cambios en el apetito, en la apariencia física y la protección de la mandíbula. Las observaciones diarias estuvieron a cargo del técnico veterinario y

el investigador; mientras que tres veces por semana esto fue supervisado por el médico veterinario.

Los animales permanecieron en sus jaulas hasta completar el periodo predeterminado (7 a 14 días).

Aplicaciones del Láser de baja intensidad

La terapia de láser de baja intensidad fue aplicada mediante dispositivo láser de diodo semiconductor, un fotón-plus de galio-aluminio-arseniuro (Laser TWIN, MMOptics®, San Carlos, Brasil) (Ver Anexo 13, Figura 07), el cual cuenta con un sistema que funciona en el espectro infra-rojo. Se aplicó una potencia de salida de 40mW por 20 segundos, a una longitud de onda continua de 660 nm. La sonda que suministra el haz de láser cuenta con un diámetro de 1 mm. Se colocó el zócalo de la luz en contacto con los tejidos blandos extraoralmente a nivel del alvéolo experimental. (Ver Anexo 13, Figura 08)

La primera aplicación de láser fue realizada aleatoriamente por un especialista, el cual, seleccionó con el método de la moneda la hemiarcada para irradiar. Dicha aplicación se realizó inmediatamente después de la extracción; mientras que el lado contrario no estuvo expuesto al láser, representando el grupo control. Las aplicaciones subsiguientes fueron realizadas por el investigador posterior a la intervención. Asimismo, se contó con la supervisión del especialista en láser para verificar todas las medidas necesarias de bioseguridad y de bienestar del animal. Dichas aplicaciones fueron repetidas cada 48 horas por 6 días, aplicando una dosis de 1 J/cm², lo que nos da un total de 3J.⁶

Protocolo de Sacrificio

Se procedió respetando la resolución N° 714 del 20 de junio 2002 del Consenso Federal de Medicina Veterinaria (CFMV) en el que establecen los procedimientos y métodos de eutanasia en animales y de otra procedencia.

La eutanasia se realizó empleando pentobarbital de sodio a dosis de 50mg/kg de peso vivo (Halatal®) como sedante por vía intramuscular. Luego de cinco minutos se colocó el agente eutanásico 2 ml/animal compuesto por embutramida,

yoduro de mebezonium y clorhidrato de tetracaína (T61®), lo que provocó un paro cardiorrespiratorio.

Las ratas fueron asignadas al azar en dos grupos (10 ratas cada uno) de acuerdo con la fecha de sacrificio, 7 y 14 días después de la extracción, respectivamente.

Disección de la mandíbula

Para la obtención de las muestras óseas se realizó la disección completa de la mandíbula. Se usó hoja de bisturí N°11 y mango N°3; utilizando dos hojas nuevas para cada rata; la mandíbula se colocó en un fijador para microscopía óptica de rutina, el cual, estuvo constituido por formol al 10%. (Ver Anexo 14: Figura 09) El sacrificio se realizó en el Ambiente de experimentación en la Facultad de Veterinaria y Zootecnia en la sede de San Martín de Porres para posteriormente trasladar cada muestra obtenida al Laboratorio de Histología del Departamento de Medicina y Cirugía Buco maxilofacial para el procesado del tejido obtenido.

Cada espécimen fue sellado y rotulado en relación a la codificación que previamente se les fue asignado a cada espécimen.

Enmascaramiento

Una persona ajena a la investigación seleccionó al azar los códigos de cuatro dígitos para cada lado intervenido y otro código por cada espécimen (Ejemplo: 9574 el lado derecho y 3846 el lado izquierdo ambos correspondientes al espécimen 2847). Se registró dicha información indicando el código correspondiente al lado y la muestra. Dicha información se entregó al técnico de histología, el cual, desconocía el lado que recibió terapia durante el estudio. Asimismo, dicha información fue archivada por un investigador ajeno al análisis histomorfométrico.

Estudio Histomorfométrico

El corte de las muestras se realizó en sentido horizontal a nivel de los dos alveolos (con y sin aplicaciones de láser). Dicho procedimiento lo realizó un técnico con experiencia en el procesado y tinción de las muestras.

Fijación

Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 10% taponeada en solución fosfato al pH 7,4 por 48 horas.

Descalcificación

La muestra se colocó en ácido nítrico por aproximadamente 16 horas.

Inclusión

Se deshidrataron en soluciones crecientes de alcohol (1 hora de alcohol al 70%, 80%, 90% y en alcohol absoluto). En seguida fueron diafanizadas en xilol por 3 horas e incluidas en bloques de parafina. Luego se bañaron en xileno durante 3 horas y se incluyeron en el bloque de parafina, para después recibir 3 baños de dos horas de parafina tras su inclusión.

Cortes

Las piezas fueron cortadas con micrótopo manual. Las secciones histológicas fueron de 4 micras.

Tinción

Los cortes fueron desparafinizados. Dichas láminas fueron procesadas pasando por dos inmersiones de xilol de 10 minutos cada uno, alcohol absoluto por 5 minutos, alcohol de 95%, 90%, 80% y 70% por 5 minutos cada uno respectivamente. Luego se lavó con agua corriente por 3 minutos.

Las muestras fueron coloreadas con hematoxilina eosina, sumergiéndose por 5 minutos, pasando instantáneamente en eosina durante 1 minuto. Secuencialmente por un enjuague rápido, para sumergirlo en alcohol de 70 % durante 30 segundos, alcohol al 95% durante 30 segundos, alcohol absoluto durante 3 minutos. Posteriormente, pasó por una inmersión en solución de etanol y xileno en una proporción de 1:1 durante 5 minutos, 5 minutos de inmersión en xileno y de nuevo recojo durante 5 minutos.

Finalmente, los cortes fueron montados y recubiertos con el cubreobjetos, para posteriormente ser analizados en un microscopio de luz multicabezal en el Departamento Académico de Medicina y Cirugía Bucomaxilofacial de la Facultad de Estomatología.

Microscopio de luz multicabezal

La neoformación ósea se determinó teniendo en cuenta los criterios descritos en la definición de las variables y estuvo a cargo del investigador y del asesor; para las observaciones se emplearon lentes de 20x.

Análisis histomorfométrico

Para facilitar la realización de la medición se colocó una lámina de 1cmx1cm; con 100 líneas verticales y 100 líneas horizontales que se intersectan entre sí. Se tomaron las microfotografías de lo observado con una cámara Nikon D3100. (Ver Anexo 14: Figura 10) Se realizó el conteo diferencial de puntos, a través de la ubicación de las líneas verticales y horizontales que coinciden con los límites del alveolo dental el conteo de las intersecciones que hay dentro de las trabéculas; y se procedió a sacar el porcentaje de estos en relación al total. Los datos se registraron en una ficha ad hoc confeccionada para dicho procedimiento.

El análisis histomorfométrico fue realizado por códigos registrados en cada lámina, siendo enmascarado el grupo control y el grupo experimental. Asimismo, la terminología y unidades utilizadas fueron las recomendadas por el Comité de Nomenclatura Histomorfometría de la Sociedad Americana de Investigación Ósea y Mineral. (Ver Anexo 07)

VI.5 Consideraciones Éticas

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

Los animales que se usaron en la investigación se consideraron un objetivo tan importante como el de obtener resultados experimentales, minimizando cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir. Esto fue tan importante tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la legislación sobre animales de investigación. (Ver anexo 15) Se trabajó y experimentó con los animales moralmente manifestándoles tres tipos de actitudes²⁷:

- Respeto: Se les trató con todas las consideraciones que merecen.
- Afecto: considerándolos partícipes con nosotros, del misterio de la vida.
- Gratitud: Se reconoció por la importante ayuda al constituir los más íntimos colaboradores.

Asimismo, se contó con el personal adecuado para el manejo de los animales, desde el ambiente de experimentación, en la intervención quirúrgica, los controles y el sacrificio de los animales. Además, tener el principio de las tres “R” establecidas por el Comité institucional de ética de los animales^{28,29}:

- Reemplazo: Ratas (animal de menor escala filogenética, que según Dannan y Alkattan²⁸ tiene un 11% de estudios como modelo pre-clínico para regeneración ósea a nivel oral y craneofacial). (Ver Anexo 15)
- Reducción: 8 ratas para la prueba piloto, que es el mínimo número de muestra para observar resultados, y 20 ratas para la ejecución del mismo.^{27,31-33}
- Refinamiento: Se contó con los especialistas, y el ambiente adecuado para la manutención del animal. (Ver Anexo 03, Anexo 05, Anexo 16)

VI.6 Plan de análisis

Para el análisis estadístico de los resultados histomorfométricos obtenidos de los alveolos con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad, y su comparación con su respectivo control, se utilizó el programa SPSS 20.0 ® para Windows por un investigador enmascarado con la codificación.

En este trabajo de investigación se fijó un nivel de significancia de 0.05 que corresponde a un intervalo de confianza del 95 %.

En la estadística descriptiva, la variable Neoformación Ósea (cuantitativa), medida histomorfométricamente, se describió utilizando la media aritmética y la desviación estándar.

En la estadística analítica se efectuó con la prueba de normalidad Shapiro-Wilk por el número de la muestra; obteniéndose una distribución normal de los datos ($p > 0,05$). Posteriormente, se realizó la prueba paramétrica T-Student para muestra independientes para comparar la densidad de la neoformación ósea de los alveolos a los 7 y 14 días de observación por cada subgrupo; asimismo, para comparar la densidad obtenida por el grupo con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad.

VII. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo de tesis se han obtenido evaluando los alvéolos dentales correspondientes a veinte ratas Holtzman como animales de experimentación, por intermedio del análisis histomorfométrico (Conteo diferencial de puntos) y cuya distribución a boca dividida estuvo durante un periodo de 7 días y 14 días.

La densidad de la neoformación ósea de los alvéolos sin aplicaciones de láser de baja intensidad, obtenida a los 7 días fue de $57,88\% \pm 10,76$; mientras que la densidad ósea a los 14 días fue $69,24\% \pm 6,90$. No existe diferencia estadísticamente significativa en la densidad ósea obtenida en el grupo control según los cortes de tiempo a los 7 y 14 días (Prueba t- Student para muestras independientes; $p > 0,05$).

La densidad de la neoformación ósea de los alvéolos con aplicaciones de láser de baja intensidad, obtenida a los 7 días fue de $49,30\% \pm 18,34$; mientras que la densidad ósea a los 14 días fue $55,24\% \pm 9,85$. No existe diferencia estadísticamente significativa en la densidad ósea obtenida en el grupo experimental según los cortes de tiempo a los 7 y 14 días (Prueba t- Student para muestras independientes; $p > 0,05$).

Al comparar la densidad de la neoformación ósea con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando histomorfometría ósea a los 7 días y 14 días. A los 7 días se obtuvo al grupo con láser una densidad de la neoformación de $49,30\% \pm 18,34$ y al grupo sin láser $57,88\% \pm 10,76$, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa, obteniéndose un $p=0,346$. A los 14 días se obtuvo al grupo con láser una densidad de la neoformación de $55,24\% \pm 9,85$ y al grupo sin láser $69,24\% \pm 6,90$, encontrándose diferencia estadísticamente significativa con un $p=0,017$ (T-Student, $p < 0,05$).

Tabla 1. Comparación la densidad de la neoformación ósea en los alveolos sin aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.

Densidad de la Neoformación Ósea (%)				
Periodos de Observación	X ± DS	Mín	Máx	P
7 días	57,88 ± 10,76	47,43	77,35	0,055
14 días	69,24 ± 6,90	59,82	79,09	

Prueba t-Student para muestras independientes

Nivel de significancia 0,05

Tabla 2. Comparación la densidad de la neoformación ósea en los alveolos con aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.

Densidad de la Neoformación Ósea (%)				
Periodos de Observación	X ± DS	Mín	Máx	P
7 días	49,30 ± 18,34	27,64	74,56	0,501
14 días	55,24 ± 9,85	42,63	68,45	

Prueba t-Student para muestras independientes

Nivel de significancia 0,05

Tabla 3. Comparación la densidad de la neoformación ósea en los alveolos con y sin aplicaciones de láser de baja intensidad, utilizando histomorfometría ósea a los 7 y 14 días.

		Densidad de la Neoformación Ósea (%)	
Periodos de observación		X ± DS	P
7 días			
	Con láser	49,30 ± 18,34	0,346
	Sin láser	57,88 ± 10,76	
14 días			
	Con láser	55,24 ± 9,85	0,017
	Sin láser	69,24 ± 6,90	

Prueba T-Student para muestras independientes

Nivel de significancia 0,05

VIII. DISCUSIÓN

Los modelos pre-clínicos de menor filogenia ideales para evaluar reparación y regeneración ósea en defectos y alveolos dentales, descrito en la Guía de Osteología, son las ratas *Sprague Dawley*; a diferencia de modelos para evaluar tejido blando, implantes óseos y/o dentales que requieren de otro tipo de especímenes con características distintas como el chanco, el mono y el can. Las ratas *Sprague Dawley* o también conocidas en el español como Holtzman^{11,34}, presentan diversas ventajas como modelo pre-clínico, debido a que ofrece periodos cortos de evaluación, costo relativamente bajo, microflora controlable, antecedentes genéticos conocidos, entre otras ventajas. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones las cuales se lograron controlar por ser un espécimen pequeño, tales como la necesidad de equipos quirúrgicos y de evaluación microscópica, además de presentar diferentes estructuras anatómicas en comparación con los humanos, así como diferente respuesta histopatológica descrita en la bibliografía.³⁰

La longitud de onda seleccionada para la TLBI fue de 660nm la cual es la mínima necesaria para la penetración en los tejidos, a diferencia de lo descrito en la literatura, en el rango de los 600 a 700nm para tejidos superficiales y para tejidos más profundos longitudes más largas en el rango 780 a 950nm;^{7,8,9} sin embargo, debido a que estos parámetros son considerados para evaluar proceso de reparación ósea en modelos clínicos; por el tamaño de modelo pre-clínico se seleccionó esta longitud de onda de 660nm. Asimismo se seleccionó una potencia de 40mW según la potencia empleada en los diversos estudios como Fávoro-Pipi *et al*², Fronza *et al*³, Cepera *et al*⁵ y El-Maghrabyn *et al*⁶, considerándose el tipo de tratamiento y el espécimen que utilizaron en cada estudio.

El análisis de la densidad de la neoformación ósea de los alveolos sin aplicaciones de láser de baja intensidad o grupo control, obtenida a los 7 días fue de 57,88% ± 10,76; mientras que la densidad ósea a los 14 días fue 69,24% ± 6,90. Asimismo, se obtuvo en los alveolos tratados con aplicaciones de láser de baja intensidad o grupo experimental, a los 7 días 49,30% ± 18,34; mientras que la densidad ósea a los 14 días fue 55,24% ± 9,85. En ambos grupos no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas en la densidad ósea según los cortes de tiempo a los 7 y 14 días; sin embargo, se observa una mayor densidad de neoformación a los 14 días, demostrando una mayor cicatrización ósea del alveolo en cada grupo según el transcurrir del tiempo, lo que demuestra un comportamiento con características aparentemente normales.

Al comparar la densidad de la neoformación ósea del grupo control y el grupo experimental, utilizando histomorfometría ósea a los 7 días no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con y sin láser, obteniéndose un $p=0,346$. Empero, a los 14 días se obtuvo diferencia estadísticamente significativa con un $p=0,017$, obteniéndose una mayor cicatrización en el grupo sin láser. A pesar de que en el grupo de los 7 días no se encontró diferencia estadística significativa en ambos grupos se observa mayor porcentaje de hueso neoformado en el grupo control.

Dentro de la literatura descrita, en los tejidos isquémicos o estresados se libera NO que al unirse a una ROS como el superóxido produzca una reacción patógena, formando aniones de peroxinitrito, el cual tiene un efecto extremadamente citotóxico. Asimismo, este NO compite constantemente para desplazar el oxígeno de la unión al CCO en la cadena de transporte de electrones, interrumpiendo la producción de energía a nivel mitocondrial y a su vez liberar radicales libres, lo que aumenta el estrés oxidativo e inhibe la respiración celular. Ambas reacciones desencadenan mayor grado de inflamación frente a los diferentes tejidos lo que retarda el proceso de cicatrización.

Es así que la TLBI ha propuesto como uno de sus grandes beneficios, la fotólisis y/o fotodisociación de dicha molécula,^{7,9,10,12} previniendo una gran respuesta inflamatoria; sin embargo, esta propuesta no ha sido lo suficientemente evidenciada, considerándose posibles bioestimulaciones en la producción de NO, lo que desencadena lo mencionado anteriormente; y en base a los resultados obtenidos por este estudio, un menor porcentaje de neoformación ósea.

En base a lo obtenido por este estudio, difiere de lo obtenido por Korany *et al*²⁶ en el 2012 y El-Maghrabyn *et al*⁶ en el 2013, ambos estudios evaluaron

neoformación ósea en alvéolos dentales obteniendo diferencia estadísticamente significativa en el grupo de los 7 días y en el segundo estudio a los 3, 7, 14 y 21 días; sin embargo, en el estudio de Korany *et al*²⁶ no se encontró diferencia estadísticamente significativa en los grupos de 3 y 10 días. Cabe mencionar que esta diferencia puede deberse a que en ambos estudios se les aplicó rayos gamma simulando las radioterapias que reciben los pacientes con tumores en cabeza y cuello, lo cual puede generar mayor liberación de radicales libres y la terapia de laser de baja intensidad actuar a nivel de estos radicales, logrando una menor respuesta inflamatoria. Asimismo, en ambos estudios se utilizó diferentes dosificaciones y frecuencias en la terapia de láser; siendo una aplicación de 75mW con una longitud de onda de 830nm y tres aplicaciones por una semana de 30mW por 3 minutos con una longitud de onda de 904nm en Korany²⁶ y El-Maghrabyn⁶, respectivamente; y que difiere al presente trabajo, la cual fue de tres aplicaciones interdiarias por una semana de 40mW por 20 segundos y una longitud de onda de 660nm.

Park *et al*¹ en el 2015 evaluaron la terapia de láser de baja intensidad de galio-aluminio-láser de diodo de arseniuro con una longitud de onda de 980-nm; en el cual, se extrajeron los primeros molares superiores de 24 ratas, dividiéndose al azar en cuatro grupos, en los que los alvéolos se irradiaron durante 0, 1, 2, o 5 min cada día, durante 3 o 7 días. La TLBI aumentó la expresión de todos los genes RUNx2, colágeno tipo 1, osteocalcina, factor de crecimiento β derivado de plaquetas y factor de crecimiento vascular endotelial, dependiendo del tiempo de exposición. Los niveles más altos de expresión se obtuvieron en el grupo de 5 minutos, a los 7 días. Cinco minutos de irradiación mostraron aumentos destacados de la expresión de todas las proteínas en ambos cortes de tiempo; concluyendo que la TLBI tuvo efectos positivos en las primeras etapas de cicatrización ósea de los alvéolos post-extracción en ratas, dependiente al tiempo de exposición. Empero en base a estas conclusiones el tiempo ideal para obtener un cambio a nivel de las proteínas es con aplicaciones mayores a los tres minutos, a diferencia a lo realizado en este estudio con aplicaciones de 20 segundos, por aplicación.

A diferencia de todos los estudios previamente mencionados si bien incorporan en su diseño metodológico la aleatorización de los grupos en los diferentes cortes de tiempo, no aleatorizan la selección del área a recibir la terapia así como no se realizan enmascaramiento en la diferentes etapas del estudio tal como se realiza en la presente investigación; basándonos en las *Guidelines del ARRIVE*³⁵ y de la *SYRCLE's*³⁶ específicos para estudios en animales, aleatorizando y enmascarando cada etapa del estudio.

Existen diversos estudios que han demostrado la efectividad de la terapia de láser de baja intensidad, así como sus diversas aplicaciones tales como Korany *et al*²⁶, Cepera *et al*⁵, El-Maghrabyn *et al*⁶, Fronza *et al*³, de la regeneración ósea a nivel de sutura palatina, alvéolo dental, defecto entre otros; sin embargo, existen estudios los cuales no encontraron beneficios con las aplicaciones de la terapia del láser de baja intensidad como García-Morales *et al*²⁴ y Korany *et al*²⁶ en estabilidad de implantes y regeneración ósea. Asimismo, entre estos estudios difieren en el diseño y tipo de estudio como objetivo, materiales y métodos.

Con respecto a lo obtenido en este estudio se rechaza la hipótesis, observándose una mayor neoformación a los 7 días en el grupo control (sin aplicaciones del láser); empero, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa. A diferencia del corte de tiempo de los 14 días, en la cual se observó diferencia estadísticamente significativa, con una mayor densidad de neoformación en el grupo control (Sin aplicaciones del láser). Sin embargo, cabe mencionar que el protocolo de radiación de láser utilizado en nuestro estudio fue seleccionado sobre la base de los resultados prometedores obtenidos en los diferentes estudios; así como, las consideraciones físicas propiamente en la acción del láser. Como no hay parámetros existentes son universalmente aceptados.

Un gran problema persistente en esta línea de investigación, es que no hay parámetros universalmente aceptados para las aplicaciones de láser en base al tipo de procedimiento, dosificaciones y tiempo de tratamiento. Se deberían continuar realizando diferentes estudios, pues desde el punto de vista en aportes a nivel médico, se lograrían diversos beneficios para los pacientes.

En la actualidad, la literatura al relacionar densidad de la neoformación ósea en alvéolos dentales y la terapia de láser de baja intensidad, es muy escasa por lo cual es importante como base de futuras investigaciones en cuanto a esta teoría. En lo obtenido de este estudio, se realizaron en su mayoría comparaciones con los pocos trabajos de investigación internacionalmente disponible ya que es un tema que aun se está estudiando.

Los resultados encontrados, en general, aportan hallazgos como una primera línea de investigación, en tal sentido es vital la realización de nuevas investigaciones para fortalecer los conocimientos y los beneficios de la terapia de láser de baja intensidad en el campo de la regeneración ósea.

IX. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio las aplicaciones de láser de baja intensidad, no influye en la densidad de la neoformación ósea en alveolos post-extracción en mandíbula de ratas.
2. La densidad de la neoformación ósea en alveolos tratados sin laser de baja intensidad es mayor la neoformación a los 14 días, observándose una mayor cicatrización ósea del alveolo en cada grupo según el transcurrir del tiempo, lo que demuestra un comportamiento con características aparentemente normales; sin embargo, no existe diferencia estadística significativa
3. La densidad de la neoformación ósea en alveolos tratados con láser de baja intensidad es mayor a los 14 días, observándose una mayor cicatrización ósea del alveolo en cada grupo según el transcurrir del tiempo, lo que demuestra un comportamiento con características aparentemente normales; sin embargo, no existe diferencia estadística significativa.
4. La densidad de la neoformación ósea en alveolos tratados con y sin laser de baja intensidad no obtuvo diferencia estadísticamente significativa en el periodo de observación de los 7 días. A diferencia del periodo de los 14 días que se obtuvo diferencia estadísticamente significativa; observándose mayor neoformación en el grupo control (sin láser).

X. RECOMENDACIONES

1. Realizar nuevas investigaciones con la terapia de laser de baja intensidad diferentes dosificaciones, desde el tiempo y el número de aplicaciones.
2. Realizar más estudios con la terapia de laser de baja intensidad evaluando con mayor diversidad de análisis desde la tomográfica en animales de mayor filogenética, otros análisis histológicos, análisis en genes tales como colágeno tipo 1, osteocalcina, derivado de plaquetas factor de crecimiento-B, y factor vascular de crecimiento endotelial, etc.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Park JB, Ahn SJ, Kang YG, Kim EC, Heo JS, Kang KL. Effects of increased low-level diode laser irradiation time on extraction socket healing in rats. *Lasers Med Sci.* 2015 Feb; 30 (2): 719-26.
2. Fávaro-Pípi E, Feitosa SM, Ribeiro DA, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, Renno AC. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(5): 727-32.
3. Fronza B, Somacal T, Mayer L, De Moraes JF, De Oliveira MG, JB Weber B. Assessment of the systemic effects of low-level laser therapy (LLLT) on thyroid hormone function in a rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013; 42: 26 –30.
4. Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol.* 2010 Nov-Dec; 85(6):849-55.
5. Cepera F, Torres FC, Scanavini MA, Paranhos LR, Capelozza Filho L, Cardoso MA, Siqueira DC, Siqueira DF. Effect of a low-level laser on bone regeneration after rapid maxillary expansion. *Am J Orthod Dento facial Orthop.* 2012; 141(4): 444-50.
6. El-Maghraby EM, El-Rouby DH, Saafan AM. Assessment of the effect of low-energy diode laser irradiation on gamma irradiated rats' mandibles. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(7): 796-805.
7. Carroll J, Milwars M, Cooper P, Hadis M, Palin W. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent materials.* 2014; 30: 465-75.
8. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 2012; 40: 516–33.
9. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 2009 Sep 1; 7 (4):358-83.
10. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response.* 2011; 9(4): 602-18.

11. DeCS-Descriptores de ciencias de la salud. Biblioteca virtual en salud. [Consultado el 30 de Setiembre del 2017]. Disponible en: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>
12. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004 Jan; 69 (1): 81-90.
13. Santiago VC, Piram A, Fuziy A. Effect of soft laser in bone repair after expansión of the midpalatal suture in dogs. *AJO-DO*. 2012; 142 (5): 615-24.
14. Passanezi E, Andreotti C, Rubo de Rezende R, Aguiar S. Lasers in periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2015 (67): 268-91.
15. Low S, Mott A. Laser technology to manage periodontal disease: a valid concept? *J Evid Base Dent Pract*. 2014; 14S: 154-9.
16. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*, 2003; 30: 809-18.
17. Darby I, Chen ST, Buser D. Ridge preservation techniques for implant therapy. *Int J Oral Maxillo fac Implants*, 2009; 24:260-71.
18. Ten Heggeler JM, Slot DE, Van der Weijden GA. Effect of socket preservation therapies following tooth extraction in non-molar regions in humans: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 2011; 22: 779-88.
19. Misch CE, Dietsh-Misch F, Misch CM. A modified socket seal surgery with composite graft approach. *J Oral Implantol* 1999; 25(4): 244-50.
20. Pagni G, Pellegrini G, Giannobile WV, Rasperini G. Postextraction Alveolar Ridge Preservation: Biological Basis and Treatments. *Int J of Dentist*. 2012.
21. Lekovic V, Kenney EB, Weinlaender M, Han T, Klokkevold P, Nedic M, Orsini M. A Bone Regenerative Approach to Alveolar Ridge Maintenance Following Tooth Extraction. Report of 10 Cases. *J Periodontol* 1997; 68(6): 563-70.
22. Araújo M, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal Of Clinical Periodontology* [serial on the Internet]. (2005, Feb), [cited January 7, 2015]; 32(2): 212-218. Available from: Dentistry & Oral Sciences Source.

23. Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 714-9.
24. García-Morales J, Tortamano-NEto P, Todescan F, Silva J, Marotti J, Zezell D. Stability of dental implants after irradiation with an 830-nm low level laser: a double-blind randomized clinical study. *Laser Med Sci.* 2012; 27: 703-11.
25. Mozzati M, Martinasso G, Cocero N, Pol R, Maggiora M, Muzio G, Canuto R. Superpulsed laser therapy on healing process after tooth extraction in patients waiting for liver transplantation. *Laser Med Sci.* 2012; 27: 353-9.
26. Korany NS, Mehanni S, Hakam H, El-Maghraby E. Evaluation of socket healing in irradiated rats after diode laser exposure (histological and morphometric studies). *Arch oral biol.* 2012; 57(7): 884-91.
27. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidados de animales de laboratorio: ratón. Lima: Centro Nacional de Productos Biológica-Instituto Nacional de Salud; 2008.
28. A Dannan, F Alkattan. Animal Models in Periodontal Research: A Mini-Review of the Literature. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2007; 5(1).
29. Chandna S, Hegde S, Bathla. Animal models in periodontology: a review. *J Oral Health Res.* 2011; 2(2): 41-6.
30. Giannobile W, Araujo M, Bachmann A, Bornstein M, Braun T, Dahlin C, Gruber R, Rios H, Rocchietta I, Schlegel K, Schmid B, Schears F, Spector M, Thoma D. Osteology guidelines for oral & maxillofacial regeneration. Preclinical models for translational research. Britain: Ed. Quintessence publishing; 2011.
31. Kikenny C, Browne W, Cuthill I, Emerson M, Altman D. Refinement & Reduction of animals in research. National. National Centre for the Replacement, 3R^sThe arrive guidelines. Animal research: reporting of in vivo experiments. [Consultado el 27 de Noviembre del 2014]. Disponible en: <http://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>.
32. Russell W.M.S., Burch, R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London, 1959. Disponible en: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc

33. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*. 2006; 2(3): 252-6.
34. DeCS-Descriptores de ciencias de la salud. Biblioteca virtual en salud. [Consultado el 10 de Febrero del 2015]. Disponible en: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>
35. Kilkenny C, Browne W, Cuthill I, Emerson M, Altman D. The ARRIVE guidelines checklist. *Animal research: Reporting in vivo experiments*. PLoS Biol. 2010 Jun.
36. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol*. 2014 Mar 26; 14-43.

ANEXOS

ANEXO 01

VARIABLE INDEPENDIENTE

Variable	Definición Operacional	Indicador	Tipo	Escala	valores
Tratamiento de Reparación de tejidos	Medida terapéutica para la cicatrización y neoformación de tejido ósea	Aplicaciones de láser de baja intensidad en los alveolos	Cualitativo, Dicotómica	Nominal	-Con láser de baja intensidad -Sin láser de baja intensidad

VARIABLE DEPENDIENTE

Variable	Definición Operacional	Indicador	Tipo	Escala	valores
Neoformación Ósea	Área trabecular total que corresponde al tejido óseo neoformado en el alveolo	Histomorfometría Conteo de cruces de las trabéculas óseas neoformadas en el alveolo	Cuantitativa	Razón	Porcentual

CO-VARIABLE

Covariable	Definición Operacional	Dimensiones	Indicador	Tipo	Escala
Tiempo	Período comprendido entre la fecha de colocación del material y la fecha de la evaluación	7 y 14 días	Cantidad de días entre la fecha de colocación del material y la fecha de la evaluación	Cualitativa, Dicotómica	Intervalo

ANEXO 02

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha:

Código N°: _____

NEOFORMACIÓN ÓSEA (%)	7DIAS	14 DÍAS
CON LÁSER DE BAJA INTENSIDAD		
SIN LÁSER DE BAJA INTENSIDAD		

ANEXO 10



Figura 01. Anestesia Intramuscular



Figura 02. Asepsia y antisepsia extraoral

ANEXO 11



Figura 03. Anestesia Local Intraoral

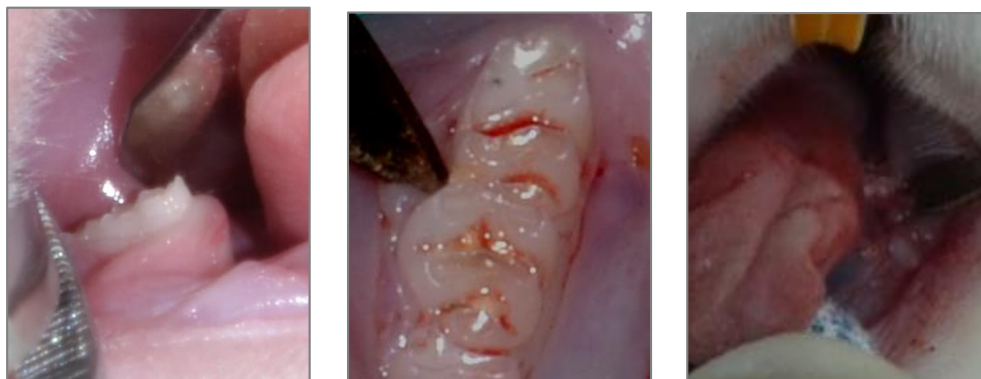


Figura 04. Exodoncia dental

ANEXO 12



Figura 05. Instrumental para exodoncia de Microcirugía



**Figura 06. Especialista de Cirugía Bucal y Maxilofacial
Especialista de Periodoncia**

ANEXO 13



Figura 07. Equipo de Lser TWIN; MMOptics, San Carlos, Brasil

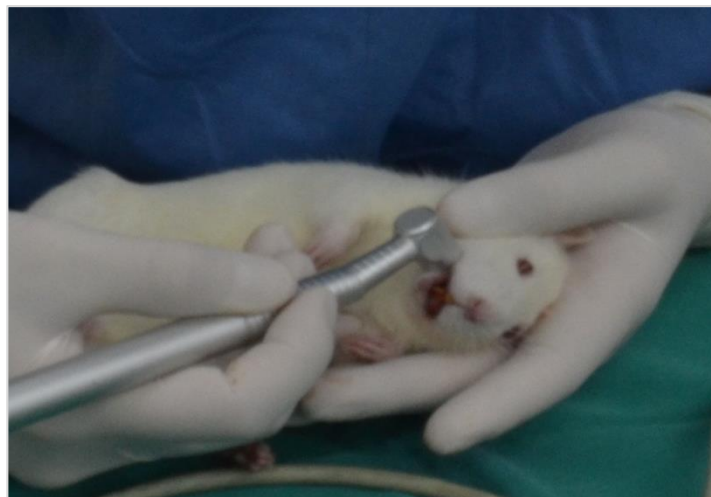


Figura 08. Aplicación de Terapia de Láser de Baja Intensidad

ANEXO 14



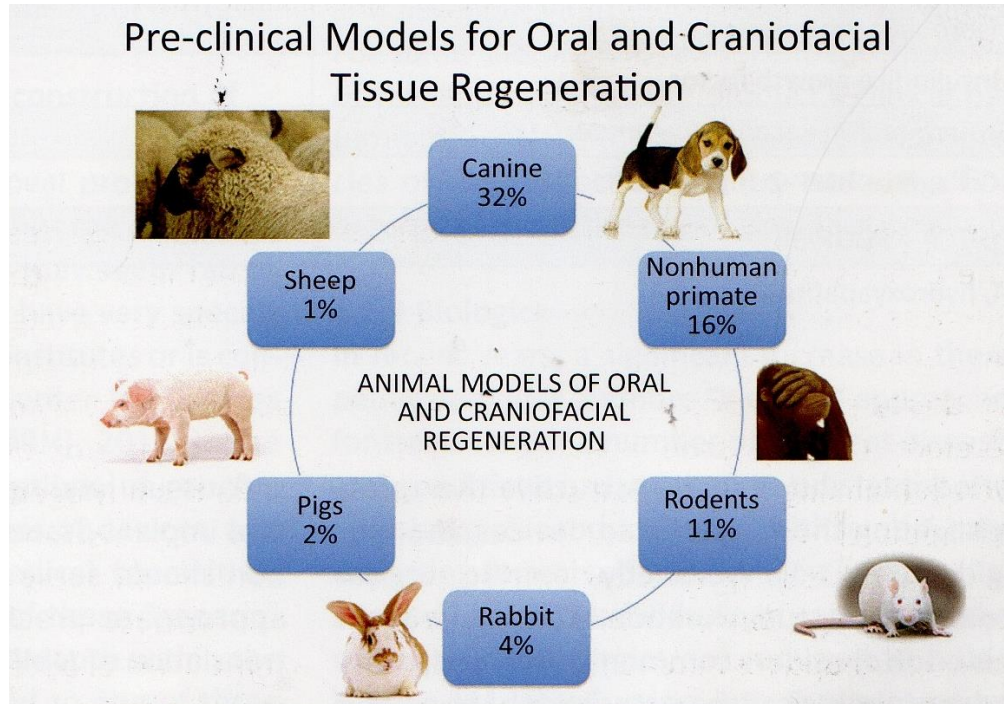
Figura 09. Disección de Mandíbulas en formol al 10%



Figura 10. Microcopia de Luz Multicabezal

ANEXO 15

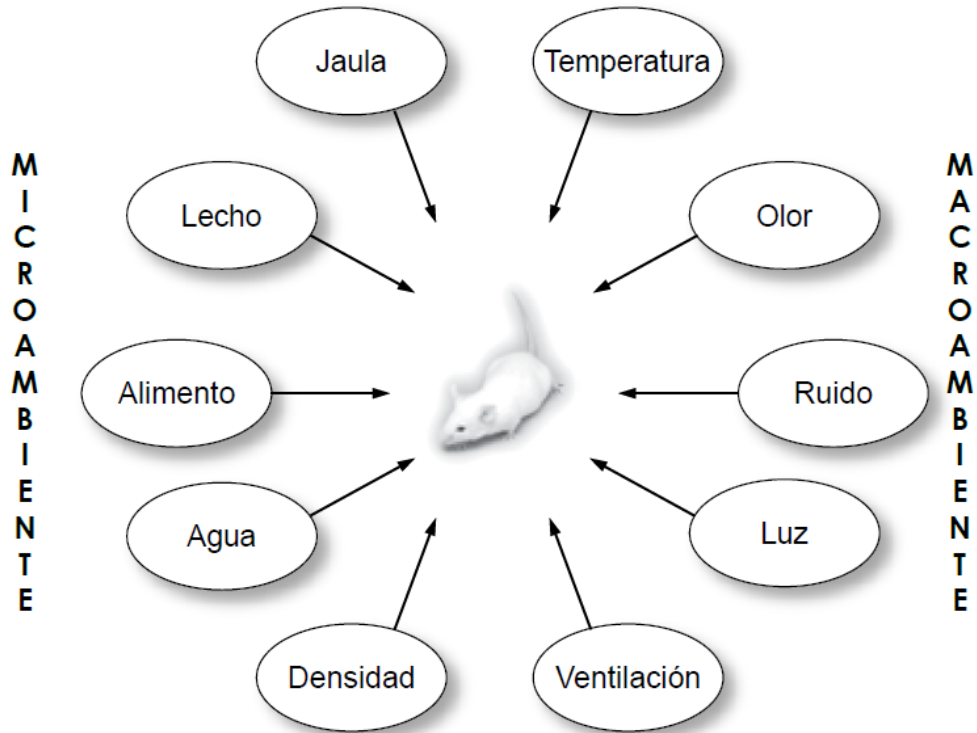
MODELOS PRE-CLÍNICOS EN EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES



Giannobile W, Araujo M, Bachmann A, Bornstein M, Braun T, Dahlin C, Gruber R, Rios H, Rocchietta I, Schlegel K, Schmid B, Schears F, Spector M, Thoma D. Osteology guidelines for oral & maxillofacial regeneration. Preclinical models for translational research. Britain: Ed. Quintessence publishing; 2011.²⁴

ANEXO 16

EL RATÓN: SU MACROAMBIENTE Y MICROAMBIENTE



Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidados de animales de laboratorio: ratón. Lima: Centro Nacional de Productos Biológica-Instituto Nacional de Salud; 2008.²¹

