



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN
ÓSEA EN DEFECTOS CON
XENOINJERTO CUBIERTOS CON
MEMBRANA DE FIBRINA RICA EN
PLAQUETAS Y MEMBRANA DE
COLÁGENO: ESTUDIO
HISTOMORFOMÉTRICO EN CONEJOS
(*Oryctolagus Cuniculus New Zealand*)**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA

**ROCÍO DEL PILAR VALLADARES
MATURRANO**

LIMA - PERÚ

2018

ASESOR DE ESPECIALIDAD

Esp. Mg. Marco Alarcón Palacios

Departamento Académico de Clínica Estomatológica

ASESOR METODOLÓGICO

Mg. CD. Carlos Espinoza Montes

Departamento Académico de Medicina y Cirugía Bucomaxilofacial

Mg. CD. Katty Ríos Villasis

Departamento Académico de Estomatología del Niño y adolescente

DEDICATORIA

A la memoria de mi querida abuelita Albina, que pusistes tus esperanzas en mi y que con tus ejemplos de constancia y perseverancia me enseñanzas a perseguir y cumplir mis sueños. Gracias por ser mi luz, porque sé que, donde estes me acompañas a no rendirme a seguir este camino y hoy este logro es también tuyo mi amada abuelita.

AGRADECIMIENTO

- A Dios por su inmenso amor, por haberme guiado para llegar hasta este punto, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y permitirme cumplir cada meta que me trazo.
- A mi familia, por su amor, apoyo incondicional, dedicación y empeño para ayudarme a ser cada día una mejor persona. Gracias por su inmenso esfuerzo para que pudiera seguir y alcanzar mis sueños.
- A Donny Moya, mi cómplice, mi apoyo incondicional, gracias por tu amor hacia mí que me sirvió de motivación para lograr la realización de esta tesis.
- A mis asesores, por la orientación, apoyo, paciencia que me permitió contar con ellos siempre para la realización de esta tesis.
- Al Dr. Emil Correa Quispilaya, por su tiempo, ayuda desinteresada y por brindarme algunos equipos para la realización de esta investigación.
- A la Dra. Sandra Bezada Quintana, por su tiempo, confianza y ayuda desinteresada en la realización de esta investigación.
- Al Dr. José Salazar, por su tiempo, ayuda incondicional y por brindarme las instalaciones de su clínica Veterinaria para la ejecución de la investigación.
- A mis amigos: Lizeth, María Luisa, Jhonatan, Karen y Elizabeth por ayudarme desinteresadamente en la ejecución de esta investigación, por darme la mano cuando la necesitaba.
- A la Facultad de Veterinaria de la UNMSM, por permitirme realizar en sus instalaciones parte de la investigación.
- A todas las personas que me ayudaron directa e indirectamente en el desarrollo de la presente investigación.

RESUMEN

Objetivo: Comparar la densidad de la neoformación ósea en defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas (PRF) y membrana de colágeno (MC) en calota de conejos a las 3 y 5 semanas. **Materiales y Métodos:** Catorce conejos de la raza Nueva Zelanda se dividieron aleatoriamente en 2 grupos (n=7). Se crearon dos defectos con un diámetro de 10mm y profundidad de 1.5mm en el hueso parietal de la calota de los conejos. En el grupo I se colocó el xenoinjerto (Bio Oss®) cubierto con una MC (BioGide®) y en el grupo II, el xenoinjerto (Bio Oss®) cubierto con PRF. El segundo defecto óseo fue el control negativo que no recibió ningún biomaterial. Los conejos se sacrificaron después de 3 y 5 semanas; luego, el hueso parietal fue removido y procesado histomorfométricamente. **Resultados:** Se utilizó ANOVA y Tukey. A las 3 semanas no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$). Pero, a las 5 semanas, el grupo PRF fue mayor significativamente ($p<0.05$). **Conclusión:** La densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubierto PRF a las cinco semanas fue mayor significativamente que los defectos controles y mayor que los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con MC.

PALABRAS CLAVES: Fibrina, Regeneración ósea, Membrana de Colágeno

ABSTRACT

Objective: To compare the density of new bone formation in xenograft treated defects covered with platelet rich fibrin membrane (PRF) and collagen membrane (MC) in rabbit shell at 3 and 5 weeks. **Methods:** Fourteen rabbits of the New Zealand breed were randomly divided into 2 groups (n = 7). Two defects with a diameter of 10mm and a depth of 1.5mm were created in the parietal bone of the rabbit shell. In group I xenograft (Bio Oss®) covered with a MC (BioGide®) was placed and in group II, the xenograft (Bio Oss®) covered with PRF. The second bone defect was the negative control that did not receive any biomaterial. Rabbits were sacrificed after 3 and 5 weeks and the parietal bone was removed and processed histomorphometrically. **Results:** ANOVA and Tukey were used. At 3 weeks, no significant differences were found ($p > 0.05$). However, at 5 weeks, the PRF group was significantly higher ($p < 0.05$). **Conclusion:** The density of new bone formation in defects treated with xenograft covered PRF at five weeks was significantly greater than the control defects and greater than xenograft-treated defects covered with MC.

KEY WORDS: Fibrin, Bone Regeneration, Collagen Membrane

ÍNDICE DE TABLAS

		48
TABLA 1.	Densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas, utilizando histomorfometría ósea a la tercera y quinta semana.	49
TABLA 2.	Densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno, utilizando histomorfometría ósea a la tercera y quinta semana.	50
TABLA 3.	Densidad de la neoformación ósea en los defectos de los grupos controles, utilizando histomorfometría ósea a la tercera y quinta semana.	51
TABLA 4.	Comparación de la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo experimental con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno, y el grupo control a la tercera semana.	53
TABLA 5.	Densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo experimental con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno, y el grupo control a la quinta semana.	55
TABLA 6.	Densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo experimental con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno, y el grupo control a la tercera y quinta semana.	

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
GRÁFICO 1. Comparación de la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo experimental con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno, y el grupo control a la tercera semana.	52
GRÁFICO 2. Densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo experimental con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno, y el grupo control a la quinta semana.	54

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AH	:	Análisis histomorfométrico
BHA	:	Hidroxiapatita bovina
BCP	:	Fosfato de calcio bifásico
BMP	:	Proteínas morfogenéticas óseas
cm	:	Centímetro
Fig	:	Figura
G	:	Calibre
IGF	:	Factor de crecimiento tipo insulina
IL	:	Interleuquina
Kg	:	Kilogramo
MC	:	Membrana de colágeno
ml	:	Mililitros
mm	:	Milímetros
PDGF	:	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PRF	:	Fibrina rica en plaquetas
PTFE	:	Politetrafluoretileno
ROG	:	Regeneración ósea guiada
TGFB1	:	Factor de crecimiento transformante beta 1
TNF	:	Factor de necrosis tumoral
VEGF	:	Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	3
II.1. Planteamiento del problema	3
II.2. Justificación	4
III. MARCO TEÓRICO	7
IV. OBJETIVOS	29
IV.1. Objetivo general	29
IV.2. Objetivos específicos	29
V. HIPÓTESIS	31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	32
VI.1. Diseño del estudio	32
VI.2. Población	32
VI.3. Muestra	33
VI.3.1. Distribución del grupo de estudio	33
VI.4. Criterios de selección	34
VI.5. Variables	35
VI.6. Técnicas y/o procedimientos	36
VI.6.1. Método	37
VI.6.2. Manejo preoperatorio	37
VI.6.3. Intervención quirúrgica	41
VI.6.4. Manejo postoperatorio	43
VI.6.5. Protocolo de sacrificio	44
VI.6.6. Recogida de muestra	45

VI.6.7. Procesamiento de muestras	45
VI.6.8. Evaluación	46
VI.7. Plan de análisis	47
VI.8. Consideraciones éticas	48
VII. RESULTADOS	50
VIII. DISCUSIÓN	61
IX. CONCLUSIONES	72
X. RECOMENDACIONES	73
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
XII. ANEXOS	82

I. INTRODUCCION

La pérdida de hueso alveolar causada por enfermedad periodontal avanzada, defectos congénitos, perforaciones radiculares, pérdida de piezas dentales, etc.; se continúa a lo largo de la vida, sin tener en cuenta el sexo, la edad ni condición social; altera la arquitectura propia del hueso y aunque este tejido sea capaz de regenerarse y remodelarse de manera espontánea, muchas veces nos encontramos con un gran defecto óseo que debido a sus dimensiones y condiciones no puede regenerarse por sí sólo y limita al paciente no sólo funcional sino estéticamente convirtiéndose en una gran problema.

Actualmente, recuperar el contorno, forma ósea y altura, ha conllevado a la comunidad científica a realizar innumerables investigaciones sobre biomateriales que permitan recuperar aquel tejido óseo perdido y lograr un éxito en rehabilitación funcional con un reborde alveolar adecuado posibilitando realizar diversos tratamientos convencionales o implantológicos con resultados óptimos.

La necesidad de encontrar aquel biomaterial de regeneración ósea ideal que reemplace aquel tejido óseo perdido ha ido mejorando con la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de matriz orgánica e inorgánica biocompatibles con el tejido óseo que no solo cumplan con ser un aporte científico, sino que también presenten un impacto social, que permita al profesional realizar

tratamientos regenerativos a un costo probablemente más accesible para los pacientes. Es por ello, que con los recientes informes científicos que resaltan la capacidad regenerativa de la membrana de fibrina rica en plaquetas, producto autógeno que viene siendo usado con éxito clínico en diferentes áreas de cirugía reconstructiva; lo que ha conllevado a estudiar esta membrana de fibrina bioactiva como posible biomaterial idóneo para la regeneración ósea.

El propósito de la presente investigación fue comparar la densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno utilizando histomorfometría ósea, en calota de conejos de la raza Nueva Zelanda.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

II.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las prometedoras posibilidades en cirugía reconstructiva vienen desarrollando nuevos avances en relación al tratamiento de defectos del reborde alveolar. Las actuales técnicas quirúrgicas buscan corregir estas deformidades y promover un futuro protésico – rehabilitador con una estética adecuada.

En el pasado, ante estas deformidades en los rebordes, se tenía como única opción sustituirlas con materiales protésicos con el fin de restaurar el contorno maxilar. Si bien los resultados clínicos eran pónicos gruesos, mal adaptados y alargados, que formaban prótesis con sobrecontorno, se lograba simular aquel tejido blando y óseo perdido, solucionando o minimizando las dificultades morfológicas presentes, pero al mismo tiempo no ofrecían un resultado estético aceptable.

Con el auge de la Regeneración ósea guiada, que sigue una secuencia lógica y natural, se logra minimizar las deformidades, permitiendo la preservación de los rebordes mediante la neoformación ósea. Actualmente, existe una variedad de biomateriales para este fin; sin embargo, múltiples factores generan desventajas en la obtención de los mismos. Hasta la fecha se busca

aquella membrana que permita no sólo la recuperación de aquel tejido óseo perdido sino que sea un biomaterial accesible a todos.

El uso de la membrana de fibrina rica en plaquetas, que es una matriz de fibrina autóloga rica en plaquetas, citoquinas, leucocitos y células madre, resulta ser una estrategia disponible capaz de modular o mejorar la regeneración del tejido óseo y conectivo en general.

Por lo expuesto, se desea saber si ¿existirá mayor densidad de la neoformación ósea de los defectos provocados en calota de conejos, tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas que con aquellos cubiertos con membrana de colágeno?

II.2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, uno de los problemas típicos en la regeneración ósea es la elección del biomaterial adecuado que pueda ser colocado en el defecto óseo y permita reparar y proporcionar estabilidad mecánica necesaria. En esa inmensa búsqueda, cabe mencionar a aquel biomaterial que es un gran concentrado de plaquetas y que no es más que la fibrina rica en plaquetas, que es una matriz estrictamente autóloga y que el éxito de usarla depende principalmente de la velocidad de recogida y transferencia a la centrifugadora de la sangre estrictamente autóloga (protocolo establecido por Chouckroun).

La presente investigación tiene una justificación teórico-científica porque si bien existen innumerables estudios científicos que evidencian los efectos de la fibrina rica en plaquetas como biomaterial en la Regeneración ósea guiada, este nuevo conocimiento permitirá aportar y destacar el efecto de la membrana de fibrina rica en plaquetas junto con un sustituto óseo en la neoformación ósea. Además, su valor científico radica no sólo en la búsqueda de nuevos resultados sino que se recurrirá al aporte científico de la técnica histomorfométrica para ver densidad ósea. También, tiene una justificación clínica porque permitirá diseñar y ejecutar protocolos de tratamiento que serán utilizados por los odontólogos que realizan procedimientos regenerativos cuando se desee lograr la reparación de los tejidos blandos y duros en menor tiempo, fácil manejo y con óptimos resultados. Así mismo, tiene una justificación metodológica ya que el protocolo utilizado se basó en lo establecido en el conceso de la ITI donde se tomaron varias consideraciones como la elección del modelo experimental animal adecuado, edad, sexo y el tamaño del defecto óseo a evaluar, lo cual servirá de guía para futuros procedimientos experimentales cuando se desee evaluar procesos de regeneración ósea con mayor precisión y así poder extrapolar resultados.

Finalmente, tiene una justificación social porque sabiendo que la membrana de fibrina rica en plaquetas es un biomaterial autólogo y de cicatrización que en comparación con antiguos protocolos plaquetarios que requerían componentes adicionales, cuenta con una técnica bastante sencilla, sólidos fundamentos científicos, buenas características de manejo durante la etapa

intraoperatoria y sobre todo es una membrana de bajo costo en comparación a otros biomateriales que encontramos hoy en el mercado y que son utilizados para el proceso de Regeneración ósea guiada, permitiendo que este biomaterial sea más accesible a todos y que los odontólogos puedan utilizarla de manera más frecuente en su práctica clínica diaria generando tratamientos de calidad con óptimos resultados.

III. MARCO TEÓRICO

El hueso es un tejido conectivo especializado caracterizado principalmente por presentar una matriz orgánica mineralizada con un metabolismo altamente complejo, lo que lo convierte en un tejido capaz de regenerarse y repararse.¹

La arquitectura del tejido óseo y la disposición de sus componentes está asociada a su función según la Ley de Wolff “La forma sigue a la función”, macroscópicamente existe dos formas de organización ósea: el tejido esponjoso o hueso trabecular, que está formado por finas trabéculas que se entrecruzan formando una red que alberga y sirve de soporte a la médula ósea. Está situado en el interior del hueso y tiene un aspecto poroso como una esponja, siendo su actividad principal la metabólica. El hueso cortical o compacto que forma una masa sólida sin espacios visibles conforma el 80% de la masa de nuestro cuerpo y presenta una mayor organización morfofuncional. Su masa es cuatro veces mayor que la del hueso esponjoso, constituyendo la periferia de todos los huesos del cuerpo, brindando protección y soporte.^{2,3}

El periostio es una capa de tejido conectivo denso con gran capacidad osteogénica que rodea la superficie externa del hueso y el endostio que es una delgada capa de tejido conectivo con una gran cantidad de células que tapiza

el espacio medular y los espacios de la sustancia esponjosa. Ambas capas celulares presentan gran capacidad osteogénica.^{2,3}

El tejido óseo está conformado por una matriz ósea extracelular, un conjunto de células y una serie de factores de crecimiento. La matriz ósea está conformada por un componente orgánico y otro inorgánico o mineral.² Consta de un andamiaje de fibras colágenas entretejidas entre las que se encuentran pequeños cristales de hidroxapatita carbonatada. La parte inorgánica o mineral constituye el 99% de su peso, y es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso.³ La parte orgánica de la matriz, juega una amplia variedad de funciones y determina la estructura y las propiedades mecánicas y bioquímicas del tejido. Siendo las fibras de colágeno tipo I, el principal constituyente, en un 95%. Además, la presencia de la sustancia fundamental conformada por carbohidratos y proteoglicanos entre los cuales tenemos al condroitín sulfato, ácido hialurónico y otras moléculas proteicas secretas por los osteoblastos en menor proporción que representan el 10 a 15%, como la osteocalcina, osteonectina, osteopontina y la sialoproteína ósea.³

Entre los factores de crecimiento y citoquinas encargadas de la diferenciación, activación, crecimiento y recambio de las células óseas, se encuentran el factor de crecimiento transformante beta (TGF BETA), factor de crecimiento tipo insulina (IGF), los factores de necrosis tumoral (TNF), las interleucinas (IL) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Además estos factores desencadenan los procesos de formación y remodelación ósea.⁴

Las células óseas son las responsables de producir, mantener y modificar la estructura del tejido óseo. Los osteoblastos, encargados de la síntesis de proteínas colágenas y no colágenas, intervienen en la mineralización de la matriz osteoide y regulan la reabsorción a través de la síntesis de citoquinas y factores de crecimiento; los osteocitos, que resultan de los osteoblastos atrapados en la matriz mineralizada tienen como función principal controlar el remodelado óseo, mediante el fenómeno mecanotransducción y los osteoclastos, encargados de la remodelación ósea.⁴

El hueso es un tejido dinámico que está continuamente en un proceso constante de aposición y reabsorción, permitiendo mantener el volumen óseo y la reparación del daño tisular. Este proceso equilibrado recibe el nombre de Remodelado óseo que durante el año consiste en un remodelado de 20% de hueso esponjoso y 5 % de hueso cortical.⁴ Así mismo, este proceso se da durante toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo.

En Periodoncia, Implantología y Cirugía Bucomaxilofacial, nos encontramos a menudo con grandes defectos óseos originados por infecciones, traumatismos o resecciones oncológicas, que ocasionan severos problemas funcionales y/o estéticos y que necesitan tratamientos bastante complejos. Durante los últimos años, los avances en el campo de la reconstrucción ósea vienen discutiendo diversos métodos para reparar aquellos grandes defectos óseos, investigando una gran cantidad de biomateriales, con el propósito de lograr una reconstrucción que garantice resultados óptimos; en el campo de

la regeneración ósea se distinguen dos tipos de defectos, aquellos que no tienen la capacidad de autoregenerarse de forma espontánea durante toda la vida del individuo (defectos de tamaño crítico) y los que sí poseen dicha capacidad (de tamaño no crítico), siempre que existan las condiciones adecuadas como, mantenimiento del espacio, estabilización del coágulo, reposo mecánico (regeneración ósea guiada).⁵

El concepto de la creación de un sitio anatómico aislado con el objetivo de promover la regeneración ósea se introdujo por primera vez hace 50 años, cuando filtros de acetato de celulosa eran experimentalmente utilizados para la regeneración de los nervios y los tendones.⁶

De Oliveira y col.⁷, encontraron formación de hueso nuevo en defectos de tibia de conejos. En la región craneofacial, se han reportado resultados exitosos después de la colocación de barreras mecánicas en defectos de mandíbulas en conejos y en defectos craneales en ratas.^{8, 9} Estos estudios experimentales proporcionaron evidencia significativa de que la regeneración ósea se ha mejorado significativamente cuando se impide mecánicamente el crecimiento de los tejidos blandos en los defectos óseos; sin embargo, la mayoría de autores en estos primeros estudios atribuyeron el éxito de las barreras a la preservación y protección del coágulo de sangre, en lugar de la colonización del espacio aislado por las células ontogénicas.¹⁰

El protocolo terapéutico de la Regeneración ósea guiada implica colocación quirúrgica de una membrana oclusiva celular frente a la superficie del hueso,

con el fin de sellar físicamente el sitio que necesita regeneración.¹¹ Además, la membrana crea y mantiene un espacio aislado, permitiendo la proliferación de las células osteoprogenitoras, la diferenciación del linaje osteoblástico y la expresión de la actividad osteogénica.¹²

En el contexto del tratamiento en Regeneración ósea guiada se han utilizado una gran variedad de materiales de membranas en estudios experimentales y clínicos. Entre estos materiales tenemos: politetrafluoroetileno (PTFE), ampliación de PTFE (ePTFE), colágeno, aloinjertos de duramadre liofilizados, poliglactina 910, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poliortoéster, poliuretano, polihidroxibutirato, sulfato de calcio, micro mallas de titanio, y láminas titanio.¹³

Se han mencionado ciertos criterios que deben poseer las membranas utilizadas para dirigir la regeneración de los tejidos:

- Biocompatibilidad.
- Oclusividad celular, para evitar el crecimiento del tejido conectivo fibroso al espacio cubierto por la barrera, membrana y así mismo, proteger la herida contra una invasión bacteriana si se llega a exponer la membrana.
- Integración a los tejidos del huésped, para lograr una integración adecuada tisular que permita facilitar la neoformación ósea.

- Ser clínicamente manipulable y capaz de generar un espacio apropiado en el cual el nuevo tejido óseo pueda formarse y la regeneración ósea se pueda dar.¹³

La membrana de politetrafluoroetileno amplificado (ePTFE) fue el primer material de barrera más frecuentemente utilizado para regeneración periodontal y ósea. Su gran éxito en Regeneración ósea guiada, lo llevó a convertirse en el material estándar.¹³ Sin embargo, uno de los inconvenientes para el uso del PTFE, es que debido a su característica de no ser reabsorbible y biodegradable, se requería una segunda intervención quirúrgica con el fin de ser eliminado, para lo cual se sometía al paciente a estrés psicológico, riesgo de daño de los tejidos, convirtiéndose en un factor negativo desde el punto de vista costo-beneficio.¹⁰ Por ello, este inconveniente condujo a la utilización de membranas biodegradables o reabsorbibles, como; colágeno tipo I, poliuretano, poliglactina 910, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioritoéster y diferentes copolímeros de ácido poliláctico y poligaláctico, los cuales han sido evidenciados en muchos estudios científicos con gran éxito en regeneración periodontal y ósea.^{14, 15}

Las membranas reabsorbibles contienen componentes biocompatibles que no dañan los procesos de cicatrización. Dentro de estas membranas se lleva a cabo un proceso de hidrólisis en donde hay reabsorción y los productos eliminados son incorporados por los tejidos para convertirlos en agua y anhídrido carbónico y por ello no requieren una segunda intervención

quirúrgica. Se ha encontrado que hay una regeneración ósea más precoz con las membranas reabsorbibles que con las membranas e-PTFE, lo que puede estar dado por una mayor estimulación de la osteogénesis o por la liberación de factores de crecimiento por parte de las células inflamatorias que se encuentran alrededor de las membranas reabsorbibles.¹⁴ Sin embargo, algunos estudios indican como principal inconveniente de usar membranas reabsorbibles la poca capacidad que presentan al mantener el espacio debajo de la misma, a causa de su escasa rigidez respecto a otros tipos de membranas no reabsorbibles.¹⁶

Numerosos estudios evidencian la efectividad del uso de las membranas de colágeno en la regeneración ósea, donde el colágeno Tipo I, es el principal componente. Presentando una estructura con dos capas, una es porosa y la otra es compacta y su uso permite la migración de las células osteogénicas y evita la infiltración del tejido conectivo.¹⁷

Muchos estudios en animales de experimentación señalan que las células mesenquimatosas pueden diferenciarse en células osteogénicas bajo múltiples circunstancias y en ausencia de proteínas óseas específicas, las fibras colágenas en Regeneración ósea, sirven como estímulo a células osteogénicas en defectos óseos y también como barrera contra la infiltración de tejido conectivo. Por ello, las fibras colágenas constituyen el componente más abundante de la matriz ósea y actúan como reservorio de muchos factores locales en la matriz celular de células osteogénicas.¹⁷ Así mismo, un estudio presentó resultados de Regeneración ósea indicando variaciones histológicas

y celulares en la osteogénesis con el uso de las membranas de colágeno, debido a sus propiedades osteoconductoras.¹⁸

Sumado a estas características, las membranas de colágeno demuestran de manera convincente que pueden reducir la reabsorción de los injertos de hueso autólogo. Se plantean discusiones con respecto a cómo estas membranas pueden ayudar a mantener el hueso; los modelos preclínicos en ovejas han demostrado que los osteoclastos se distribuyen principalmente en el injerto de hueso¹⁸, de acuerdo con estos resultados, los defectos maxilares en ratas mostraron que los osteoblastos, pero no los osteoclastos se encuentran adyacentes a la membrana de colágeno, lo que permitiría una mejor reparación del defecto.¹⁹ Si bien, los resultados presentados en estudios realizados en animales confirmaron los hallazgos clínicos obtenidos anteriormente ello conllevó a su aplicación en humanos, donde las membranas permanecieron en posición durante 6 a 8 meses, el resultado demostró un relleno óseo entre 90 y 100%, después de un período de observación de 30 meses, los autores concluyeron que la Regeneración Ósea Guiada es un procedimiento previsible en condiciones de cicatrización normal.^{19, 20}

Muchos estudios han demostrado la efectividad de las membranas de colágeno^{15, 17, 19}; sin embargo; es necesario evaluar otros biomateriales que puedan ser utilizados en los procesos de regeneración ósea guiada. En los últimos años, un gran número de evidencias científicas^{20, 21} vienen resaltando

la importancia de la concentración de plaquetas en el biomaterial a utilizar como la clave principal para la regeneración ósea. Diversas publicaciones muestran una gran variedad de técnicas para la obtención de plaquetas que puedan ser utilizadas en diversas situaciones clínicas. Es así que, en el 2001, un nuevo protocolo fue sugerido en Francia por Choukroun y col.²¹, como un nuevo concentrado de plaquetas y fibrina en una forma simple sin modificación de la sangre, fue la fibrina rica en plaquetas (PRF).²²

La membrana de PRF de Choukroun, es una segunda generación de plaquetas definido como un biomaterial autólogo, incorporando en una matriz de fibrina autóloga gran cantidad de leucocitos, plaquetas y factores de crecimiento de la sangre.²³ Diferente a otras concentraciones de plaquetas, esta técnica no requiere ningún anticoagulante o trombina bovina o ningún agente gelificante. Este protocolo permite obtener un concentrado de plaquetas con grandes beneficios a un bajo costo y con una técnica bastante sencilla para ser utilizada en diversas áreas de cirugía oral y maxilofacial.²³ Recientemente, la última clasificación mundial de concentrados de plaquetas se publicó, y se dividió en 4 familias con respecto a su contenido de leucocitos y de fibrina. La membrana de fibrina rica en plaquetas propuesta por Choukroun es actualmente el único producto que pertenece a la clase L-PRF (leucocitos y plaquetas ricas en fibrina), que posee un alto contenido de leucocitos y una arquitectura consistente de la fibrina.²⁴ Las membranas de PRF liberan gradualmente grandes cantidades de factores de crecimiento de los gránulos alfa de las plaquetas tales como factor de crecimiento transformante beta 1

(TGFB 1), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF – AB), factor de crecimiento endotelial vascular VEGF y glicoproteínas de la matriz (tales como trombospondina 1, fibronectina y vitronectina) por un periodo de 7 días en una matriz de fibrina in vitro. Los factores de crecimiento y los leucocitos juegan un rol importante para una adecuada cicatrización de los tejidos superficiales y del hueso, principalmente en la estimulación de la neoangiogénesis.^{25, 26} Estudios in vitro han comprobado la capacidad de la membrana de fibrina rica en plaquetas en la estimulación e incrementación de muchos tipos de células diferentes, tales como fibroblastos, adipocitos, osteoblastos, y queratinocitos.^{27, 28} Además, la membrana de fibrina rica en plaquetas induce la diferenciación osteoblástica y promueve la angiogénesis mediante la presencia de leucocitos produciendo grandes cantidades de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) implicados en este proceso.²⁸ Por lo encontrado, la membrana de fibrina rica en plaquetas, como un biomaterial autólogo, ha evidenciado grandes resultados con enormes éxitos clínicos.

La membrana de fibrina rica en plaquetas cuenta con un protocolo que transforma el coágulo de sangre natural en una membrana bioactiva clínicamente utilizable. Posee un alto contenido de factores de crecimiento que permiten una curación natural y mejoran visiblemente los tejidos blandos y duros. La liberación de citoquinas es gradual de las plaquetas y leucocitos a medida que se produce la reabsorción fisiológica de la matriz de fibrina permitiendo regular fenómenos inflamatorios en los tejidos heridos, así mismo; las glicoproteínas de la matriz permiten la migración celular y la

proliferación rápida.²⁸ Sin embargo, es importante resaltar que la membrana de fibrina rica en plaquetas tiene una excelente función mecánica que permite la protección temprana de la herida y la ayuda en el cierre primario de los tejidos blandos.²⁸ Por ende, los investigadores vienen desarrollando este tipo de membranas de forma artificial incorporándole factores de crecimiento en las membranas de colágeno; sin embargo, el protocolo simple con el que cuenta esta membrana la viene convirtiendo en el producto bioactivo más natural disponible a ser utilizado.²²

La velocidad de recogida y el traslado a la centrifugadora de la sangre es el éxito de esta técnica, por ello una rápida manipulación es la única manera de obtener un coágulo de fibrina rica en plaquetas clínicamente utilizable. Si el tiempo de recogida de sangre y centrifugación demora mucho tiempo se producirá el fracaso y se obtendrá un pequeño coágulo de sangre sin consistencia.^{22, 32}

Debido a su consistencia la membrana de fibrina rica en plaquetas permite emplearse como una excelente membrana en regeneración ósea guiada, siendo su consistencia densa lo que le permite cubrir, proteger y estabilizar el material de injerto óseo y el sitio quirúrgico en general.²² Además su uso combinado con diversos sustitutos óseos y otros coadyuvantes que muchas veces son necesarios en defectos residuales críticos, mejoran la integración del sustituto óseo y aceleran la regeneración ósea.³³ Particularmente, la

elasticidad y resistencia de la membrana de fibrina rica en plaquetas permiten usarla como membrana suturable en diversas situaciones clínicas.

A pesar de que, hay poca evidencia científica de esta membrana cubriendo algún sustituto óseo, es claro que la gran mayoría de estudios^{44, 69, 70} encontrados utilizan esta membrana en forma de mezcla con algún biomaterial y a pesar de ello, se resaltan sus innumerables ventajas como, la fácil producción y bajo costo para su obtención, la que la convierten en uno de los materiales a considerar como opción de uso en cirugía oral y maxilofacial. Además su característica de ser totalmente autóloga, no limita su uso en cuanto a toxicidad, ni limitaciones éticas relacionadas con este recurso natural de coágulo sanguíneo optimizado.²²

Durante la terapia de regeneración ósea, el uso de materiales de injertos como sustitutos óseos viene usándose para proporcionar un sitio adecuado para el tejido óseo que se está neofормando, así como ser el andamio que soporte y ayude a estabilizar la membrana.²⁹ Estos sustitutos óseos facilitan y mejoran la formación ósea debido a que deben presentar propiedades como osteogénesis (capacidad para producir hueso por proliferación celular de osteoblastos viables trasplantados), osteoconducción (proveer una matriz para el crecimiento de hueso nuevo a través de ella) y osteoinducción (facultad de producir hueso de las células mesenquimatosas recogidas en el injerto). A pesar de que el injerto de hueso autólogo ha sido considerado históricamente el gold estándar en terapias de regeneración ósea debido a que presenta las

propiedades de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, su mayor limitación y complicación sigue siendo la morbilidad del sitio donador, por ello se viene usando sustitutos óseos que están comercialmente disponibles para su uso en terapias de regeneración ósea, debido a que cumplen requerimientos como biocompatibilidad, adecuado soporte mecánico, osteoconductividad, biodegradación y lenta reabsorción.³⁰

Dependiendo de su origen, los sustitutos óseos están clasificados en tres grupos.³¹ Aloinjertos, de origen humano; Xenoinjertos, de otras especies usualmente bovinos o equinos y Aloplásticos, los cuales son producidos sintéticamente. Los xenoinjertos son los sustitutos óseos más utilizados debido a su biocompatibilidad y sobretodo a su lenta reabsorción lo que permite ser andamio para el nuevo hueso y que viene evidenciándose sus excelentes propiedades en diversas situaciones clínicas. Particularmente, el Bio-Oss, ha ganado ha ganado prominencia como material debido a que durante su producción remueve el andamiaje orgánico (desproteínización). Su matriz mineral remanente es similar a la del hueso humano en términos de composición química, morfología y ultraestructura. Se considera un material biocompatible ya que se ha demostrado histológicamente que posee un contacto íntimo de un 36,7% con el hueso de la superficie alrededor. Estudios en animales como en humanos documentan muy bien su efectividad y biocompatibilidad. También es biorreabsorbible y no provoca efecto inmunógeno. Las presentaciones comerciales del Bio-Oss son: en granulado

(esponjosa o de cortical) y en bloques de esponjosa, con un tamaño de cristales de 10nm.³¹

Por ello, para evaluar nuevos biomateriales, se viene utilizando el modelo experimental animal descrito por diferentes autores,^{34, 35} donde los animales más usados son los conejos debido a su elevada disponibilidad, fácil manipulación, teniendo en cuenta que su biología permite realizar procesos inducidos de regeneración ósea guiada, en los cuales el fenómeno que se produce se asemeja en uno o más aspectos al mismo fenómeno en humanos, permitiendo mejor la evaluación de dicho proceso a corto plazo.^{34, 35}

ANTECEDENTES

Bölükbaşı N. et al.³³ (2013) con el fin de comprobar la importancia que viene consiguiendo en los últimos años el uso de la fibrina rica en plaquetas (PRF), un concentrado de leucocitos y plaquetas con un gran número de factores de crecimiento; así como, comprobar su alto potencial de usarse sólo o en combinación con otros materiales de injerto; evaluaron la eficacia de la fibrina rica en plaquetas mezclada con fosfato de calcio bifásico (BCP) en la regeneración ósea en defectos óseos creados quirúrgicamente. Crearon defectos óseos de 5mm de diámetro en ambas tibias de 6 ovejas, los cuales fueron rellenados con: PRF, BCP, PRF más BCP y defectos vacíos que fueron los controles. Los animales fueron sacrificados después de 10, 20 y 40 días, y sometieron los especímenes conteniendo los defectos a análisis histológico

e histomorfométrico. No encontraron en ninguno de los grupos signos de necrosis. Pero a los 40 días, el grupo de PRF más BCP mostró los más altos ratios de hueso nuevo y los otros grupos mostraron resultados estadísticamente similares. Finalmente, concluyeron que el PRF tiene una gran eficacia porque ayudó a potenciar y acelerar la actividad osteogénica cuando estuvo en combinación con el fosfato de calcio bifásico (BCP) en defectos óseos permitiendo la formación de nuevo hueso.

Naik B. et al.³⁶ (2013) con el fin de dar a conocer los grandes beneficios de la fibrina rica en plaquetas (PRF), como una matriz de fibrina en la que las citoquinas, factores de crecimiento de plaquetas y células son atrapadas y pueden ser liberadas después de un cierto tiempo y que puede servir como una membrana reabsorbible, realizaron una revisión crítica para discutir las estrategias disponibles para usar la fibrina rica en plaquetas como un biomaterial autólogo que viene siendo usado en muchas disciplinas de la odontología. Realizaron una búsqueda electrónica de los artículos sobre la base de datos Pubmed con rango personalizado de 5 años. La búsqueda electrónica produjo 302 documentos; en base a criterios de inclusión y exclusión que fueron predeterminados en concreto, 72 trabajos fueron identificados como adecuados a los criterios de inclusión y los 230 artículos restantes fueron excluidos. Después de la adición de tres artículos más seleccionados mediante búsqueda manual, realizaron texto completo de todos los artículos recuperados y opinión. Mediante la combinación de los datos extraídos de los trabajos seleccionados, sintetizaron los datos revisados. Finalmente, demostraron los innumerables resultados prometedores de usar

la fibrina rica en plaquetas, por su buena perspectiva para su uso en temas de cicatrización en diversos aspectos de la odontología.

Pripatnanont P. et al.³⁷ (2013) investigaron el efecto de la fibrina rica en plaquetas (PRF) en la regeneración ósea de diversos materiales de injerto en defectos de calota de conejos. Dos defectos bilaterales en la calota se prepararon en 20 conejos blancos Nueva Zelanda, 10 conejos fueron tratados con PRF y los otros 10 no fueron con PRF. En ambos grupos, hueso autógeno se colocó en defectos vacíos dentro de 5 conejos y la combinación de hueso autógeno y hueso bovino desproteinizado frente hueso bovino desproteinizado (DBB), en los otros cinco. Los animales fueron sacrificados a las 8 semanas donde evaluaron la formación ósea por densitometría radiológica y análisis histomorfométrico. Encontraron que la densidad media óptica (OD) y el análisis histomorfométrico (HA) del porcentaje de hueso nuevo mostraron que los grupos PRF fueron significativamente mayores que los grupos no-PRF en el injerto de hueso autógeno. Finalmente, concluyeron que el PRF tuvo un efecto positivo en la formación de hueso cuando se utiliza solo o combinado con hueso autógeno, pero no con el hueso desproteinizado bovina.

Yilmaz D. et al.³⁸ (2014) evaluaron histológicamente y estereológicamente los efectos curativos del fosfato beta tricálcico (beta- TCP) o de la fibrina rica en plaquetas (PRF) solos o en combinación en defectos óseos estandarizados en tibias de chanchos. Crearon cuatro defectos en tres chanchos adultos de

5mm de diámetro y 5 mm de profundidad obteniendo un total de 24 defectos óseos. Estos fueron divididos en cuatro grupos según el tipo de material utilizado; en el primer grupo, los defectos no fueron rellenados y sirvieron de controles; en el segundo grupo, los defectos fueron rellenados con PRF; en el tercer grupo, los defectos fueron rellenados con fosfato beta tricálcico y en el cuarto grupo, los defectos fueron rellenados con 50% de fosfato beta tricálcico y 50% de PRF. Todos los animales fueron sacrificados a la doceava semana después de la cirugía y los huesos de tibia fueron removidos para ser preparados para su estudio histológico y estereológico. Encontraron que los estudios histológicos y estereológicos revelaron mayor formación de hueso en aquellos defectos rellenados con PRF y fosfato beta tricálcico. Finalmente, concluyeron que la fibrina rica en plaquetas combinado con el fosfato beta tricálcico ayudó a potenciar el efecto ontogénico permitiendo la formación de nuevo hueso.

Yoon JS. et al.³⁹ (2014) investigaron la influencia de la fibrina rica en plaquetas (PRF) sobre la angiogénesis y la osteogénesis en regeneración ósea guiada (ROG) usando xenoinjerto en defectos craneales de conejos. En diez conejos adultos machos, crearon dos defectos bilaterales circulares en la calota de cada conejo para lo cual utilizaron trefina. Cada uno de los sitios experimentales recibieron hueso bovino con PRF y cada uno de los sitios control recibieron sólo hueso bovino. Los animales fueron sacrificados a la primera semana, cuatro conejos; a la segunda semana, tres conejos y a la cuarta semana, tres conejos. Examinaron las muestras de biopsia por

microscopía de luz histomorfométricamente y utilizaron la tinción inmunohistoquímica para la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Encontraron que la intensidad de inmunotinción para VEGF fue consistentemente mayor en el grupo experimental que en el grupo control. Sin embargo, las diferencias entre el grupo control y el grupo experimental no fueron estadísticamente significativos en los exámenes histomorfométricos y en los exámenes inmunohistoquímicos. Finalmente, concluyeron que el PRF puede aumentar el número de células de la médula, sin embargo, el PRF con sustitutos óseos no mostró ningún efecto significativo sobre la regeneración ósea y se sugieren más estudios a gran escala para confirmar los resultados obtenidos de este estudio.

Pelegrine AA. et al.⁴⁰ (2014) compararon la cicatrización ósea observada después del uso de un andamio enriquecido con médula ósea fresca, un andamio enriquecido con fracciones mononucleares de médula ósea y un andamio solo. Utilizaron 21 conejos los cuales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de seis animales y un grupo de tres animales. Crearon defectos óseos de 12 mm de diámetro en el hueso parietal de los conejos, donde los defectos del grupo control, sólo fueron rellenados con xenoinjerto, en el grupo 1, los defectos fueron rellenados con xenoinjerto enriquecido con médula ósea fresca; en el grupo 2, con un xenoinjerto enriquecido con fracciones mononucleares de médula ósea y en el grupo 3, los defectos no se rellenaron con nada. Además, en los grupos 1, 2 y control, uno de los defectos de calota estuvo al azar cubierto por una membrana. Los

conejos fueron sacrificados a las 8 semanas después de la cirugía, y los huesos parietales fueron recolectados y analizados histomorfométricamente. No encontraron diferencias con el análisis histomorfométrico entre el grupo 1 y el grupo control con respecto al área no vital de tejido mineralizado, pero el grupo 2 presentó el mayor porcentaje del área de tejido mineralizado, seguido por el grupo 1 y el grupo control ($P < 0.05$) para ambas situaciones, con la membrana y sin membrana. Además, los lados en el que los defectos estuvieron cubiertos con la membrana de barrera mostraron una mejor cicatrización ósea en comparación con los lados no cubiertos. Finalmente, concluyeron que ambos métodos que utilizan las células del estroma de la médula ósea han contribuido a la mejora de la médula en la curación, especialmente el uso de la fracción mononuclear de la médula ósea y el uso de una membrana parecía tener un efecto sinérgico.

Acar AH. et al.⁴¹ (2015) investigaron sobre la efectividad de la fibrina rica en plaquetas (PRF) en la regeneración ósea cuando se utiliza sola o en combinación con hidroxapatita (HA) y fosfato beta tricálcico (beta TCP). Utilizaron 20 conejos blancos de la raza Nueva Zelanda y crearon cuatro defectos óseos en la calota de cada uno de los animales, donde estos fueron rellenados con PRF, Straumann (®) Bone Ceramic (SBC), PRF + SBC y un defecto se dejó sin tratar como un control. Después de 4 y 8 semanas, 10 conejos fueron sacrificados en cada uno de esos tiempos para preparar el hueso de la calota conteniendo los defectos para el estudio de tomografía computarizada y para el análisis histológico e histomorfométrico, donde

evaluaron y compararon el volumen y el área de hueso regenerado en los defectos creados. Encontraron que tanto en el análisis tomográfico como en el histomorfométrico, el PRF y el SBC aumentaron significativamente la regeneración ósea y observaron que también hubo un nuevo aumento significativo en la formación de hueso cuando se utilizó el PRF combinado con hidroxiapatita y fosfato de tricálcico. Finalmente, concluyeron que el PRF tiene un efecto positivo en la formación de hueso cuando se usa sólo o en combinación con hidroxiapatita y fosfato tricálcico.

Meza E. et al.⁴² (2015) compararon la neoformación ósea en defectos óseos de fémur de conejos tratados con membrana de fibrina rica en plaquetas (PRF) y membrana de colágeno en un periodo de 3 y 5 semanas. Crearon dos defectos óseos de 4mm de diámetro y 6mm de profundidad en el fémur izquierdo de 12 conejos de la raza Nueva Zelanda. Los animales fueron asignados al azar en dos grupos, uno de los defectos se cubrió con una membrana de fibrina rica en plaquetas o una membrana de colágeno (Neo Mem). El segundo defecto no fue cubierto con nada, fue el defecto control. A las 3 y 5 semanas los conejos fueron sacrificados (3 conejos por período). Luego, retiraron el fémur y se procesó para su estudio histomorfométrico completo. Utilizaron para el análisis de neoformación ósea el método de conteo diferencial y los datos fueron analizados estadísticamente (ANOVA, Tukey). Los resultados histomorfométricos a las tres semanas mostraron que la neoformación ósea en los defectos tratados con PRF fue similar a los defectos con membrana de colágeno ($p < 0.05$) y después de 5 semanas, la

neoformación ósea con PRF resultó ser mayor que el grupo control y menor en comparación con los defectos con membrana de colágeno ($p < 0.05$). Finalmente, concluyeron que la neoformación ósea en los defectos tratados con membrana de PRF mostraron resultados más bajos comparados histomorfométricamente con el obtenido con la membrana de colágeno y mayor cuando se compararon con los defectos control.

Knapen M. et al.⁴³ (2015) señalaron que el efecto positivo de los leucocitos y la fibrina rica en plaquetas (L-PRF) en la osteogénesis han sido ampliamente descritos *in vitro*. Sin embargo, estudios clínicos y preclínicos son muy pocos y controvertidos en la demostración del efecto positivo de los leucocitos y la fibrina rica en plaquetas en la regeneración ósea. Por ello, compararon el efecto potencial del L-PRF en un modelo estandarizado. Utilizaron 18 conejos y crearon cuatro defectos en la calota de cada uno de los animales obteniendo un total de 72 defectos y se rellenaron con tres diferentes materiales: L-PRF, hidroxiapatita bovina (BHA), BHA más L-PRF y un defecto estuvo vacío y se utilizó como control. Seis conejos fueron sacrificados en tres momentos distintos: 1 semana, 5 semanas y 12 semanas para el análisis histológico e histomorfométrico. Encontraron que no hubo diferencias estadísticas entre los cuatro grupos en términos de calidad y cantidad de nuevo hueso formado. Finalmente, concluyeron que en el presente estudio el L-PRF no parece proporcionar ningún efecto adicional sobre la cinética, la calidad y cantidad de hueso en el actual modelo de regeneración ósea guiada.

Oliveira MR. et al.⁴⁴ (2015) investigaron los efectos de la fibrina rica en plaquetas (PRF) asociada o no con Bio-Oss en defectos óseos en la bóveda craneal de las ratas. Crearon defectos óseos de tamaño crítico de 5 mm de diámetro en la bóveda craneal de 48 ratas. Luego, estos animales se dividieron en seis grupos de ocho animales cada uno, de acuerdo con el tratamiento recibido: coágulo homogéneo, coágulo autólogo, PRF autógena, PRF homogénea, Bio-Oss, o Bio-Oss asociados con PRF. Los animales fueron sacrificados después de 30 o 60 días. Evaluaron la regeneración ósea por análisis histomorfométrico y encontraron que los altos porcentajes de neoformación de hueso nuevo en 30 días y 60 días se observaron en el Bio-Oss asociado con el grupo de PRF. Finalmente, concluyeron que el PRF tuvo un efecto positivo en la regeneración ósea únicamente cuando se asoció con Bio-Oss.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar la densidad de la neoformación ósea en defectos óseos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno en calota de conejos (*Oryctolagus Cuniculus New Zealand*)

IV.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas, utilizando histomorfometría ósea a la tercera y quinta semana.
2. Determinar la densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno, utilizando histomorfometría ósea a la tercera y quinta semana.
3. Determinar la densidad de la neoformación ósea en los defectos de los grupos controles, utilizando histomorfometría ósea a la tercera y quinta semana.

4. Comparar la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo experimental con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno, y el grupo control a la tercera semana.

5. Comparar la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo experimental con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno, y el grupo control a la quinta semana.

6. Comparar la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo experimental con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de colágeno, y el grupo control a la tercera y quinta semana.

V. HIPÓTESIS

- **HIPÓTESIS VERDADERA**

La densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos de los conejos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas es mayor que la densidad de la neoformación ósea obtenida en los defectos óseos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental tipo ensayo de laboratorio

- **Según el grado de control de las variables y la forma de selección de los individuos:**

Experimental

- **Según la dirección del estudio:**

Prospectivo

- **Según el número de veces en los que se realiza la medición de las variables:**

Longitudinal

- **Según el número de muestras que se estudian:**

Comparativo

VI.2. POBLACIÓN

Conejos machos de raza Nueva Zelanda del Bioterio del Instituto Nacional de Salud.^{42, 43, 45, 46}

VI.3. MUESTRA

Catorce conejos machos de raza Nueva Zelanda de 4 a 6 meses de edad aproximadamente de 2.5kg. – 3kg. de peso.⁴²⁻⁴⁶

Para el cálculo de la muestra de la ejecución de la investigación se reemplazó los datos obtenidos de la prueba piloto (se utilizó el 10% de la muestra del artículo base)⁴³ en la fórmula de comparación de dos medias. (ver anexo 1)

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

VI.3.1. DISTRIBUCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO

La muestra estuvo conformada por 14 conejos, estos fueron divididos en dos grupos que fueron asignados de forma aleatoria y los cuales fueron de desconocimiento para el investigador, donde se aplicaron dos materiales diferentes; colocando en un grupo la membrana de colágeno (MC) (Geistlich Biogide[®]) (ver anexo 2) y el xenoinjerto (Geistlich Bio Oss[®]) (ver anexo 3) y en el otro grupo la membrana de fibrina rica en plaquetas (PRF) y el xenoinjerto (Geistlich Bio Oss[®]). Cada uno de los grupos estuvo conformado por siete conejos asignados de manera aleatoria los cuales recibieron una codificación de 4 números al azar.

El grupo N° 1 correspondió a los animales tratados con xenoinjerto (Geistlich Bio Oss[®]) y membrana de colágeno (Geistlich Biogide[®]); a cada conejo de este grupo se le realizó dos defectos óseos, de 10 mm de diámetro y 1.5 mm de profundidad,^{42, 45} uno de los defectos fue rellenado con un xenoinjerto (Geistlich Bio Oss[®]) y cubierto con membrana de colágeno (Geistlich Biogide[®]) y el otro defecto correspondió al defecto control negativo de dicho grupo (no recibió ni relleno ni membrana).

El grupo N° 2, correspondió a los animales tratados con xenoinjerto (Geistlich Bio Oss[®]) y membrana de fibrina rica en plaquetas (PRF); a cada conejo de este grupo se le realizó dos defectos óseos, de 10 mm de diámetro y 1.5 mm de profundidad,^{42, 45} uno de los defectos fue rellenado con un xenoinjerto (Geistlich Bio Oss[®]) y cubierto con membrana de fibrina rica en plaquetas (PRF) y el otro defecto correspondió al defecto control negativo de dicho grupo (no recibió relleno ni membrana).

VI.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Los 14 conejos fueron seleccionados según los siguientes criterios:

- Conejos machos en buen estado de salud.
- Conejos con edades comprendidas entre 4 y 6 meses.

- Conejos de 2.5 kg. a 3kg. de peso.
- Conejos de la misma camada.^{42, 45, 46}

Los conejos fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud; se eligieron conejos de la Raza Nueva Zelanda por su tamaño, facilidad de manejo y facilidad para obtener la sangre necesaria y convertirla en PRF sin poner en peligro al animal; teniendo en cuenta que su biología es similar al de los seres humanos lo que permite realizar procesos inducidos de regeneración ósea guiada, donde su grado de madurez ósea obtenida, es ideal para evaluar estos procesos de neoformación.³⁴

35

VI.5. VARIABLES

- **Variable Independiente:** Tipo de biomaterial

Definición Conceptual: Biomaterial utilizado para el proceso de regeneración ósea guiada; Definición operacional: Xenoinjerto con distintos tipos de membrana de recubrimiento; Indicador: Características del biomaterial; Tipo: Cualitativo; Escala de Medición: Nominal; Valores: Membrana de fibrina rica en plaquetas más xenoinjerto (Bio Oss[®]), membrana de colágeno más xenoinjerto (Bio Oss[®]) y control.

- **Variable Dependiente:** Densidad de la Neoformación ósea

Definición conceptual: Tejido óseo neoformado en el defecto óseo;

Definición Operacional: Área trabecular total que corresponde al

tejido óseo nuevo en el defecto; Indicador: Número de cruces que inciden dentro de las trabéculas óseas expresadas en porcentaje; Tipo

Cuantitativa; Escala de Medición: De Razón; Valores: Porcentual (0-100%).

- **Covariable:** Tiempo

Definición Conceptual: Período comprendido entre el inicio y final

de un evento; Definición operacional: Período comprendido entre la

fecha de colocación del biomaterial y las fechas de sacrificio

programadas; Indicador: Cantidad de semanas entre la fecha de

colocación del biomaterial y las fechas de sacrificio; Tipo

Cualitativa, Escala de Medición: Ordinal; Categorías: tercera

semana y quinta semana. (Ver anexo 4)

VI.6. TECNICAS Y/O PROCEDIMIENTOS

Se realizó una prueba piloto para determinar el tamaño de la muestra de la investigación, evaluar los periodos de observación de las variables, así mismo; para capacitar y calibrar a investigador en los procedimientos a realizar.

Para la técnica de histomorfometría ósea se realizó una calibración previa con un especialista en el área; la cual fue valorada mediante el Coeficiente de Correlación Intraclass (CCI); obteniendo un CCI Intra Sujetos de 0.97 y CCI Entre Sujetos de 0.98; cuyos valores según la escala de valoración de las concordancias establecen una *Muy buena* concordancia (Ver anexo 5)

VI.6.1. MÉTODO

El método consistió en una observación estructurada y detallada mediante microscopía de luz (Histomorfometría ósea).

VI.6.2. MANEJO PREOPERATORIO

Para la realización de la presente investigación se tomó en cuenta la Guía de manejos y cuidados de conejos del Instituto Nacional de Salud,⁴⁷ así como, las normas establecidas por el Comité Institucional de Ética de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

a. Aclimatación de los animales

Una semana antes de la intervención quirúrgica los conejos ingresaron para su aclimatación a un lugar acondicionado como bioterio, el cual siguió las normas establecidas en la guía de manejos

y cuidados de conejos del Instituto Nacional de Salud,⁴⁷ para mantener a los animales durante todo el proceso de la ejecución de la investigación, para lo cual se solicitó el permiso de una de las instalaciones de una clínica Veterinaria (ver anexo 6) y es así que los animales fueron colocados en jaulas de acero inoxidable trenzado de 48 x 60 x 50 cm². con el fin de permitirles adaptarse al medio ambiente bajo condiciones ambientales de temperatura de 18° a 22°C, con una humedad relativa de 40 a 70%, un flujo de luz de 3w/m² y del mismo modo que los ruidos no sobrepasaron los 60 decibeles permitidos. Los animales tuvieron un régimen alimentario estándar (Conejina - PURINA® Agribrand, Perú) y se administró abundante agua a demanda.^{34, 42, 45, 46, 47}

b. Observación Regular

Luego de la aclimatación se llevó a cabo el procedimiento anestésico que estuvo a cargo de un médico veterinario especializado en el manejo de animales; la intervención quirúrgica, los cuidados post operatorios y el sacrificio de los animales fueron debidamente supervisados por especialistas correspondientes de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (médico veterinario, técnico veterinario y cirujano dentista), en condiciones de asepsia adecuada.^{45, 46, 47}

c. Pre – Anestesia

Durante este periodo los animales fueron preparados para la intervención quirúrgica con la respectiva colocación de los biomateriales. Para ello, se retiró 12 horas antes de la intervención quirúrgica agua y comida.

d. Anestesia

Para la inducción anestésica se utilizó Ketamina (KET TO-100[®], Chemie, Perú) a dosis de 30 – 50 mg/kg de peso por vía Intramuscular, la cual fue mantenida con Xilacina a dosis de 1ml/kg de peso (Chemie, Perú); para ello se usaron jeringas de 1 ml y 3 ml con aguja de 26G, todo este procedimiento fue realizado por el médico veterinario especializado. El mantenimiento de la anestesia fue controlado mediante la pérdida del reflejo pupilar del ojo y la relajación del músculo esquelético de la zona quirúrgica, a cargo del médico veterinario.

Para la obtención de la membrana de fibrina rica en plaquetas, se procedió a la extracción de 9ml de sangre con aguja de calibre 19 - 23 de la vena auricular marginal de cada uno de los animales en tubos de 10 ml sin anticoagulante. Luego, esta sangre obtenida fue inmediatamente centrifugada siguiendo el protocolo de Choukroun (PC-02, Proceso Ltd., Niza, Francia) a una velocidad de 2700 revoluciones por 12 minutos.^{37, 48}

Después de la centrifugación, en la mitad del tubo se obtuvo un coágulo de fibrina, justo entre la red de células rojas en la parte inferior y el plasma acelular en la parte superior.

Después, el coágulo de fibrina fue retirado del tubo usando pinzas estériles y fue colocado en una caja metálica especial (PRF BOX MCT, Seoul, Korea). Finalmente, este coágulo de fibrina fue cubierto con la tapa de la caja que ejerce una compresión que permitió la obtención de la membrana de fibrina rica en plaquetas en dos minutos.^{22, 23,48}

Se rasuró con máquina desechable (Prestabarba3-Gillette®) la región craneal entre los pabellones auriculares luego se desinfectó pincelando la superficie cutánea con una solución de yodopovidona al 10% (Betadine®).^{49,50}

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en la sala quirúrgica de la Clínica Veterinaria Dr. Mascota para lo cual se envió la solicitud para acceder al ambiente (Ver anexo 7). Se realizaron siete intervenciones quirúrgicas diarias, a cargo de un especialista en el área de Implantología Oral que previamente fue capacitado por un Médico Veterinario sobre la zona anatómica del conejo donde se realizó la cirugía.

VI.6.3. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA (Ver anexo 8)

Se realizó toda la intervención quirúrgica con el animal en posición decúbito ventral sobre una mesa quirúrgica y se procedió al aislamiento del área a ser operada con campos quirúrgicos estériles. Todo el instrumental utilizado en la intervención quirúrgica estuvo esterilizado previamente.

Se procedió a colocar anestesia local, 0.5 ml de 2% de lidocaína con epinefrina 1: 100 000 (Xylestesin-A[®], 3M ESPE AG, Seefeld, Germany), en la periferia del área quirúrgica. Se identificó y marcó determinados puntos de referencia en la calota del animal a tener en cuenta durante la realización del acto quirúrgico. (Ver anexo 9) A continuación se realizó una incisión sagital con una hoja de bisturí N° 15 de aproximadamente de 6 cm de largo⁶⁰ sobre la línea media para exponer la superficie ósea de la calota desde la región frontal a la región occipital. La piel fue elevada con dos pinzas para hacer una incisión en el periostio similar a la de la piel y se procedió a separar el periostio de la superficie ósea con un periostótomo.^{39, 41, 50}

Se realizó un fresado progresivo con una trefina circular de 10 mm⁶⁰ de diámetro en el hueso parietal bilateral sin comprometer la sutura interparietal con irrigación constante de suero salino.^{43, 51, 52,53} Se empleó un kit de trefinas nuevas (Neodent[®], Curitiba, Brasil) por cada

intervención, montada en un motor eléctrico estéril (Saeshin[®], Corea) para obtener los defectos óseos. En cada calota se crearon 02 defectos óseos de 10 mm de diámetro y 1.5mm⁶⁰ de profundidad situados a una distancia de 4mm aproximadamente, la cual fue medida con una regla milimetrada para endodoncia, para obtener la profundidad deseada se usaron topes del sistema DASK (Dentium Co[®], Seoul, Corea) y evitar dañar la duramadre.^{40,41} Finalizado el procedimiento quirúrgico se procedió a colocar los biomateriales de investigación según los dos grupos experimentales obtenidos, en los conejos del primer grupo; un defecto fue rellenado con xenoinjerto (Geistlich Bio Oss[®], Suiza) y cubierto con membrana de PRF y el otro defecto no fue rellenado con ningún biomaterial y fue el control negativo; los conejos del segundo grupo experimental también tuvieron dos defectos óseos, un defecto fue rellenado con xenoinjerto (Geistlich Bio Oss[®], Suiza) y cubierto con membrana de colágeno (Geistlich Bio Gide[®], Suiza) y el otro defecto no fue rellenado con ningún biomaterial y fue el control negativo; los dos tipos de membranas que se usaron fueron recortadas en segmentos de 12x12mm²., medidas con una regla milimetrada de endodoncia, lo que permitió cubrir adecuadamente los defectos. Se procedió a suturar todos los planos, el periostio y la piel con hilos reabsorbibles de Poliglactina 910 (Vicryl 3/0 – Aguja semicircular atraumática),^{40, 52} luego en cada conejo operado se realizó una aplicación tópica de una solución de yodopovidona al 10% (Betadine[®]), como medida antiséptica local en el postoperatorio inmediato.⁵⁴

VI.6.4. MANEJO POSTOPERATORIO

Los conejos fueron colocados en jaulas individuales inmediatamente después de la intervención quirúrgica. Una semana después de la intervención fueron enjaulados, según el grupo de estudio.^{42, 45}

Cada jaula tuvo registrada el código de cuatro números al azar de cada animal, el biomaterial que se le colocó y la fecha de sacrificio. Los animales se identificaron con dos letras con respecto al biomaterial colocado, es así que, membrana de fibrina rica en plaquetas (MT), membrana de colágeno (MR) y control (MA), a lo anterior, se agregó cuatro números al azar de; así mismo, el tiempo de sacrificio (Ej. MT-4398-03).⁴⁵ Esta denominación fue mantenida para las muestras durante el análisis histomorfométrico.⁴⁶ (Ver anexo 10)

a. Analgesia

La analgesia se efectuó con Ketoprofeno (Profenid®, Chemie, Perú) en dosis de 10mg/kg de peso por vía intramuscular, con jeringas de tuberculina de 1ml. y aguja 26 G, inmediatamente después de la intervención quirúrgica se colocó la primera dosis y se continuó cada 24 horas por tres días.⁵³ Como antibiótico se utilizó Enrofloxacin 10% (Quinolaba Oral®, Chemie, Perú), durante 5-7 días; que fue administrado por vía intramuscular usando jeringas de tuberculina de 1ml. con aguja 26 G. El médico veterinario especializado

prescribió estos medicamentos como parte del protocolo y se aseguró que sean debidamente administrados.⁴²

b. Controles

Durante los primeros tres y cuatro días después de la cirugía, los animales fueron evaluados monitoreando sus constantes fisiológicas, temperatura, frecuencia cardiaca, además se observó señales de angustia, tales como alteraciones en el apetito, en la apariencia física y la protección de la zona afectada.^{42, 46} El monitoreo diario estuvo a cargo del investigador y supervisado por el médico veterinario, con el fin de mantener todo dentro de los parámetros normales. Los animales fueron mantenidos en sus jaulas hasta completar el tiempo de sacrificio (3 y 5 semanas).⁵⁴

VI.6.5. PROTOCOLO DE SACRIFICIO

El sacrificio de los animales fue realizado inyectando por vía intramuscular una sobredosis de lo utilizado para la anestesia de Ketamina (KET TO-100[®], Chemie, Perú) y Xilacina (Chemie, Perú) provocando la depresión del sistema nervioso del animal y luego se inyectó Pentobarbital de Sodio por vía intracardiaca provocando *exitus letalis* por paro cardiorrespiratorio.^{42, 45, 46}

VI.6.6. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Se realizó una incisión para permitir el acceso directo a la zona intervenida, lo que permitió obtener las muestras óseas. Se realizaron unos cortes con una fresa de carburo de tungsteno a baja velocidad para extraer una porción de calota, especialmente el hueso parietal de forma pentagonal que incluyó ambos defectos óseos realizados en la cirugía. Una vez extraídas las porciones de calota que contiene los defectos óseos se fijaron con formol al 10 % para microscopía óptica de rutina en frascos separados y debidamente rotulados para su identificación con el código de animal, el biomaterial colocado y la fecha de sacrificio y luego fueron trasladados al laboratorio de patología del Departamento de Medicina y Cirugía Bucomaxilofacial para el procesado del tejido obtenido.³⁴

VI.6.7. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Una vez obtenidas las muestras estas fueron sometidas a una serie de procesos histológicos que se llevaron a cabo a cargo de un técnico con la adecuada experiencia en todo el procesado y tinción de las muestras.

Primero los especímenes de calota con piel fueron fijadas en formol al 10% por 24 horas, después estas muestras fueron cortadas en sentido horizontal a nivel de los dos defectos (tanto el defecto con biomaterial como el defecto control)⁴⁵ obteniendo tres cortes por cada muestra ósea,

que fueron colocadas en formol al 10%, luego se sometieron a un proceso de descalcificación con ácido nítrico al 5% por 24 horas y lavados con agua corriente, se continuo con el proceso de deshidratación, en la cual se sometieron las muestras a una batería de alcoholes al 70%, 80%, 96% y 100%, las muestras, luego pasaron por el proceso de inclusión donde se utilizó parafina por 10 minutos en cada muestra, además las muestras fueron cortadas utilizando micrótopo a 3 micras de grosor, luego fueron sometidas a una batería de alcoholes en grado decreciente para continuar con la coloración histológica con hematoxilina y eosina para finalmente llevarse a cabo el montaje. Después de este procesamiento, se obtuvieron las láminas histológicas listas para ser visualizadas y analizadas en un microscopio de luz (BX50F4, Olympus Optical Co., Ltd., Japan).

VI.6.8. EVALUACIÓN

a. Estudio Histomorfométrico

Para la densidad ósea del nuevo hueso se tomaron en cuenta criterios ya establecidos en la definición de las variables, a cargo del investigador y del asesor, donde las observaciones de las láminas histológicas obtenidas se hicieron empleando lente de 10x.

Se utilizó una rejilla de 1 cm x 1 cm para la realización de la medición; esta rejilla contiene 100 líneas verticales y 100 líneas horizontales que se intersectan entre sí.⁵⁴ Para las fotografías se utilizó una cámara Nikon Reflex D3100. Se utilizó la técnica del conteo diferencial de puntos, para ello primero se ubicó las líneas horizontales y verticales que se encuentran dentro de los límites del defecto, luego se contó las intersecciones que hay dentro de las trabéculas óseas y de ellos se sacó un porcentaje en relación al total de intersecciones.(Ver anexo 11)

Los datos se registraron en una ficha confeccionada para dicho procedimiento. (Ver anexo 12)

VI.7. PLAN DE ANÁLISIS

Los resultados histomorfométricos de los defectos óseos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas (PRF), membrana de colágeno (MC) y su comparación con su respectivo control fueron analizados estadísticamente y para ello se utilizó el programa IBM® SPSS® versión 22.0 para Windows (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales).

Se trabajó con un intervalo de confianza del 95% que corresponde a un nivel de significancia de 0.05.

Con respecto a la estadística descriptiva, la variable densidad de la neoformación ósea, variable cuantitativa, que fue medida por el análisis histomorfométrico, se describió mediante la media aritmética y la desviación estándar.

Además, en la estadística analítica se realizaron las pruebas de normalidad; se utilizó la Prueba de Shapiro-Wilk con la cual se verificó que las variables tengan una distribución normal cuando $p > 0,05$. Después, se realizó las pruebas paramétricas *t-student* para muestras relacionadas para comparar la densidad de la Neoformación ósea de los defectos a las 3 y 5 semanas de observación por cada subgrupo; además, se realizaron las pruebas de Tukey para comparar densidad de la neoformación ósea entre cada dos grupos experimentales y la prueba de ANOVA, para comparar densidad de la neoformación ósea entre todos los grupos.

VI.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se solicitó el permiso al Comité Institucional de Ética de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Ver anexo 13) para la ejecución del presente trabajo de investigación y con la aprobación se procedió a realizar la investigación teniendo en cuenta las normas y cuidados establecidos para conejos del Instituto Nacional de Salud; así como, las normas establecidas en cuanto a cuidado y trabajo con

animales de experimentación del Comité Institucional de Ética de
Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

VII. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo de tesis se han obtenido evaluando los defectos óseos realizados en la calota de 14 conejos de experimentación a través de estudio histomorfométrico (Conteo diferencial de puntos).

En la Tabla N° 1, la densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas evaluados con el análisis histomorfométrico fue 55.68 ± 12.46 a las tres semanas de evaluación; mientras que a las cinco semanas fue 80.58 ± 12.63 .

En la Tabla N°2, la densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno evaluados con el análisis histomorfométrico fue 57.08 ± 4.58 a las tres semanas de evaluación; mientras que a las cinco semanas fue 60.17 ± 10.23 .

En la Tabla N°3, la densidad de la neoformación ósea en los defectos de los grupos controles evaluados con el análisis histomorfométrico fue 46.84 ± 9.55 a las tres semanas de evaluación; mientras que a las cinco semanas fue 56.06 ± 12.89 .

En la Tabla N°4, la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas evaluada con el análisis histomorfométrico fue 55.68 ± 12.46 a las tres semanas de

evaluación, del grupo control fue 46.84 ± 9.55 ; mientras que la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno fue 57.08 ± 4.58 . No hubo diferencias estadísticamente significativa al compararse cada dos grupos ($p > 0.05$), y tampoco cuando se compraron todos los grupos a la vez ($p > 0.05$).

En la Grafica N° 1, se compara la densidad de neoformación ósea en los defectos óseos de los dos grupos experimentales y el control a las tres semanas, encontrándose que la mediana de la densidad de la neoformación ósea del grupo xenoinjerto más MC fue mayor que los otros grupos pero las diferencias entre ellos no fue significativa.

En la Tabla N°5, la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas evaluada con el análisis histomorfométrico fue 80.58 ± 12.63 a las cinco semanas de evaluación, del grupo control fue 56.06 ± 12.89 ; mientras que la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno fue 60.17 ± 10.23 . Se encontró diferencia significativa entre el grupo de defectos óseos con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y el grupo control ($p < 0.05$) y si hubo diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos ($p < 0.05$).

En la Gráfica N°2, se compara la densidad de neoformación ósea en los defectos óseos de los dos grupos experimentales y el control a las cinco semanas, encontrándose una mayor mediana de densidad de neoformación ósea en el grupo xenoinjerto + PRF y los valores mínimos estuvieron por

encima de los otros grupos, pudiéndose señalar que los valores en este grupo son mejores en comparación que los otros en cuanto a neoformación ósea.

En la Tabla N°6, la densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno evaluados con el análisis histomorfométrico fue 57.08 ± 4.58 a las tres semanas de evaluación; mientras que a las cinco semanas fue 60.17 ± 10.23 . No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos tiempos de evaluación ($p > 0.05$).

La densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas evaluados con el análisis histomorfométrico fue 55.68 ± 12.46 a las tres semanas de evaluación; mientras que a las cinco semanas fue 80.58 ± 12.63 . No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos tiempos de evaluación ($p > 0.05$).

La densidad de la neoformación ósea en los defectos óseos del grupo control evaluados con el análisis histomorfométrico fue 46.84 ± 9.55 a las tres semanas de evaluación; mientras que a las cinco semanas fue 56.06 ± 12.89 . No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los dos tiempos de evaluación ($p > 0.05$).

TABLA N°1: DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS DEFECTOS TRATADOS CON XENOINJERTO CUBIERTOS CON MEMBRANA DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS, UTILIZANDO HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA A LA TERCERA Y QUINTA SEMANA.

TIEMPO DE EVALUACIÓN	DENSIDAD DE NEORFORMACIÓN ÓSEA	
	X(%)	DE
TRES SEMANAS	55.68	12.46
CINCO SEMANAS	80.58	12.63

X= Promedio
DE= Desviación Estándar

TABLA N°2: DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS DEFECTOS TRATADOS CON XENOINJERTO CUBIERTOS CON MEMBRANA DE COLÁGENO, UTILIZANDO HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA A LA TERCERA Y QUINTA SEMANA.

TIEMPO DE EVALUACIÓN	DENSIDAD DE NEORFORMACIÓN ÓSEA	
	X(%)	DE
TRES SEMANAS	57.08	4.58
CINCO SEMANAS	60.17	10.23

X= Promedio
DE= Desviación Estándar

TABLA N°3: DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS DEFECTOS DE LOS GRUPOS CONTROLES, UTILIZANDO HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA A LA TERCERA Y QUINTA SEMANA.

TIEMPO DE EVALUACIÓN	DENSIDAD DE NEORFORMACIÓN ÓSEA	
	X(%)	DE
TRES SEMANAS	46.84	9.55
CINCO SEMANAS	56.06	12.89

X= Promedio

DE= Desviación Estándar

TABLA N°4: COMPARACIÓN DE LA DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS DEFECTOS ÓSEOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL CON XENOINJERTO CUBIERTOS CON MEMBRANA DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS Y MEMBRANA DE COLÁGENO, Y EL GRUPO CONTROL A LA TERCERA SEMANA.

BIOMATERIAL DE RELLENO	DENSIDAD DE NEOFORMACIÓN ÓSEA				
	X(%)	DE	*p	**p	
XENOINJERTO + MC	57.08	4.58	XENOINJERTO + PRF	0.98	
XENOINJERTO + PRF	55.68	12.46	XENOINJERTO + MC	0.98	0.19
			CONTROL	0.37	
CONTROL	46.84	9.55	XENOINJERTO + PRF	0.37	

X= Promedio
 DE= Desviación Estándar
 *p = Prueba de Tukey
 **p= Prueba de ANOVA

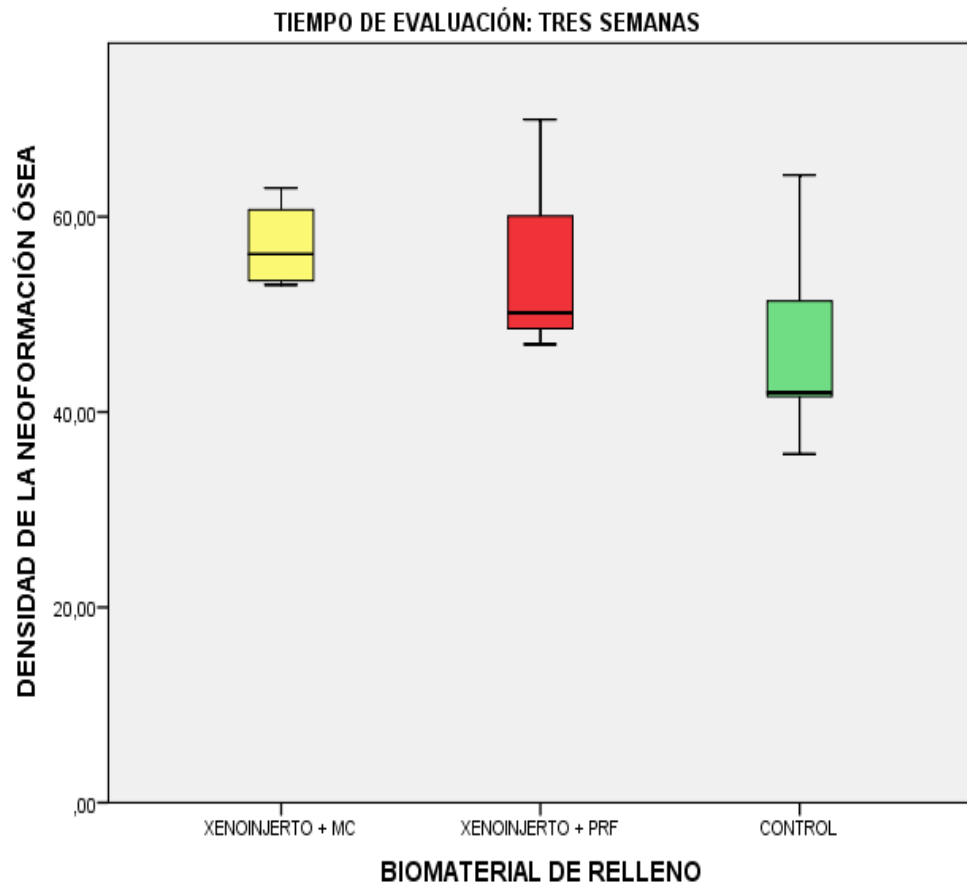


GRÁFICO 1. COMPARACIÓN DE LA DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS DEFECTOS ÓSEOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL CON XENOINJERTO CUBIERTOS CON MEMBRANA DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS Y MEMBRANA DE COLÁGENO, Y EL GRUPO CONTROL A LA TERCERA SEMANA.

TABLA N°5: DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS DEFECTOS ÓSEOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL CON XENOINJERTO CUBIERTOS CON MEMBRANA DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS Y MEMBRANA DE COLÁGENO, Y EL GRUPO CONTROL A LA QUINTA SEMANA.

BIOMATERIAL DE RELLENO	DENSIDAD DE NEOFORMACIÓN ÓSEA			
	X(%)	DE	*p	**p
XENOINJERTO + MC	60.17	10.23	XENOINJERTO + PRF	0.12
XENOINJERTO + PRF	80.58	12.63	XENOINJERTO + MC	0.12
			CONTROL	0.02
CONTROL	56.06	12.89	XENOINJERTO + PRF	0.02

X= Promedio

DE= Desviación Estándar

*p = Prueba de Tukey

**p= Prueba de ANOVA

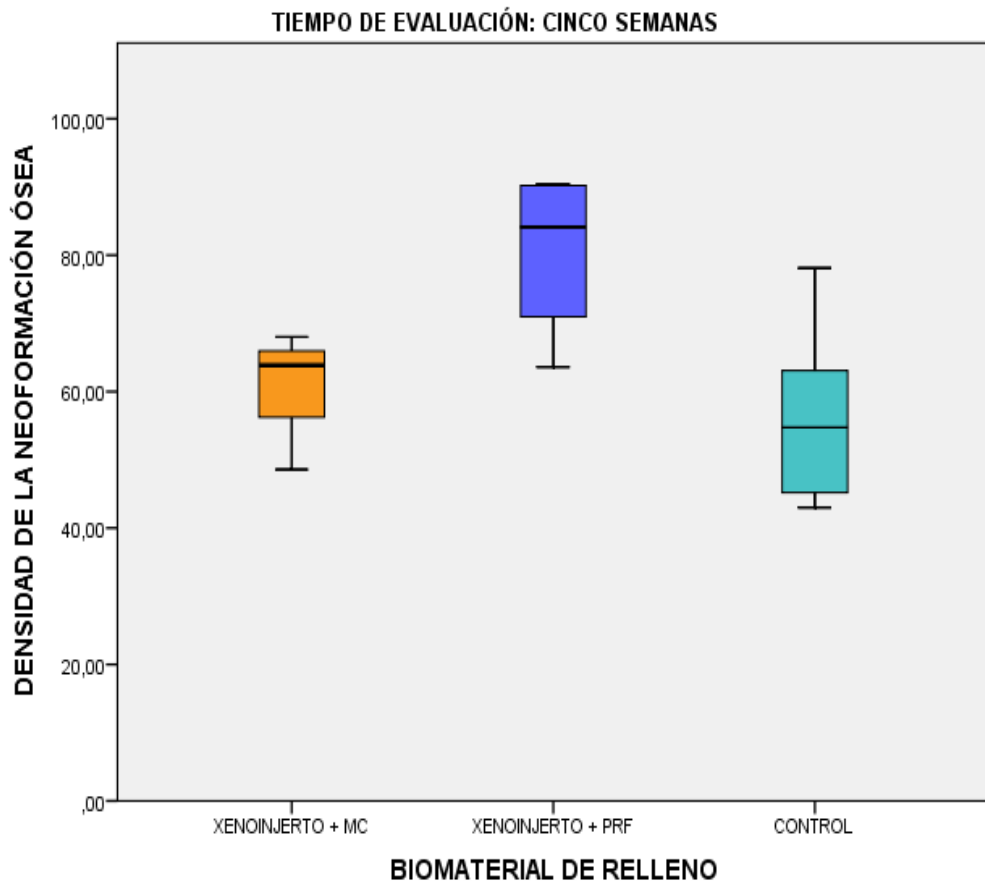


GRÁFICO 2. DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS DEFECTOS ÓSEOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL CON XENOINJERTO CUBIERTOS CON MEMBRANA DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS Y MEMBRANA DE COLÁGENO, Y EL GRUPO CONTROL A LA QUINTA SEMANA

TABLA N°6: DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA EN LOS DEFECTOS ÓSEOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL CON XENOINJERTO CUBIERTOS CON MEMBRANA DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS Y MEMBRANA DE COLÁGENO, Y EL GRUPO CONTROL A LA TERCERA Y QUINTA SEMANA.

BIOMATERIAL DE RELLENO	TIEMPO DE EVALUACIÓN	DENSIDAD DE NEORFORMACIÓN ÓSEA		
		X(%)	DE	*p
XENOINJERTO + MC	TRES SEMANAS	57.08	4.58	0.66
	CINCO SEMANAS	60.17	10.23	
XENOINJERTO + PRF	TRES SEMANAS	55.68	12.46	0.05
	CINCO SEMANAS	80.58	12.63	
CONTROL	TRES SEMANAS	46.84	9.55	0.16
	CINCO SEMANAS	56.06	12.89	

X= promedio

DE= Desviación Estándar

*p= Prueba T de Student

VIII. DISCUSIÓN

El hueso es un tejido capaz de regenerarse y remodelarse de manera espontánea, sin embargo, muchas veces nos encontramos con defectos que debido a sus dimensiones y condiciones no pueden regenerarse por sí solos y ellos son los defectos críticos; que limitan al paciente no sólo funcional sino estéticamente convirtiéndose en un gran problema terapéutico. Ante este problema, encontramos en el mercado innumerables biomateriales que permiten estimular la regeneración ósea, pero es claro y necesario encontrar aquel biomaterial idóneo en términos de respuestas biológicas, biocompatibilidad, costo y éxitos clínicos.⁵⁶

La membrana de fibrina rica en plaquetas (PRF) del Protocolo de Choukroun es un biomaterial que en los últimos años se viene utilizando con gran fuerza en diversas áreas de Cirugía Reconstructiva, siendo su uso no ajeno en odontología, ya que esta membrana contiene una gran cantidad de plaquetas, leucocitos, citoquinas y factores de crecimiento que la convierten en una matriz de fibrina autóloga de consistencia adecuada para ser utilizada como una excelente membrana en el proceso de regeneración ósea guiada,²³ permitiendo estabilizar cualquier sustituto óseo y proteger el sitio quirúrgico en general. El potencial de esta membrana de PRF como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada viene estudiándose con el objetivo de utilizarla debido a las diversas propiedades que posee y que permitan indicarla como el biomaterial idóneo para la neoformación ósea.

Con este objetivo, en la presente investigación se comparó la densidad de la neoformación ósea en defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de fibrina rica en plaquetas y membrana de Colágeno (Gold Estándar) a fin de evaluar la formación de nuevo hueso en los defectos óseos creados en calota de conejos y se evaluó el efecto de esta membrana de PRF, a través del análisis de la densidad ósea de los defectos creados; para ello se obtuvieron un total de 28 muestras (7 tratados con xenoinjerto cubierto con membrana de fibrina rica en plaquetas, 7 de su respectivo control; 7 tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno y 7 de su respectivo control) las cuales fueron analizadas por Histomorfometría ósea.

La densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto y membrana de PRF a las tres semanas de observación fue mayor que los defectos controles pero menor que la neoformación de los defectos óseos con xenoinjerto y membrana de colágeno (MC), sin diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, a la cinco semanas de observación, los defectos tratados con xenoinjerto y membrana de PRF fue significativamente mayor que los defectos controles y que los tratados con xenoinjerto y MC. Estos resultados coinciden con lo estudiado por Meza et al.⁴⁸ que evaluaron histomorfométricamente defectos óseos en fémur de conejos que fueron tratados con membrana de colágeno y membrana de fibrina rica en plaquetas en un periodo de tres y cinco semanas, encontrando a las tres semanas similar neoformación ósea en los defectos de ambos grupos experimentales, pero a las cinco semanas, la neoformación ósea obtenida con la membrana de PRF

fue mayor que el grupo control y menor que la MC. La presente investigación y el estudio de Meza et al.⁴⁸, siguieron el mismo protocolo de obtención de la membrana de PRF descrita por Choukroun^{37,48} para evaluar el potencial de esta membrana en el proceso de neoformación ósea, así como los mismos tiempos para la evaluación Histomorfométrica donde se evaluó la densidad de neoformación ósea utilizándose la técnica del conteo diferencial de puntos a la tres y cinco semanas. Cabe resaltar que mientras la regeneración ósea en humanos se da en un periodo aproximado de 2 a 8 meses⁵⁷, en un modelo animal es mucho más rápido y esto coincide mucho con estudios como el de Bodde et al.⁵⁸ que recomiendan un periodo de observación de menos de 12 semanas para evaluar neoformación ósea en modelos animales con defectos de tamaño crítico, especificándose que en un periodo de 2 a 5 semanas permitirá evaluar las primeras fases de regeneración ósea y en un periodo de más de 8 semanas, evaluar la reabsorción de los biomateriales.^{58, 59, 60}

El modelo animal experimental utilizado en la presente investigación fueron conejos de la Raza Nueva Zelanda debido a su tamaño, facilidad para obtener la sangre necesaria y convertirla en membrana de PRF sin poner en peligro al animal; además, por ser el modelo animal más apropiado y seleccionado para estudios de regeneración ósea.^{3, 34,35} Así también, se seleccionaron conejos machos, debido a que el género tiene gran influencia en las características óseas tales como geometría y tamaño^{5, 61}, además la porosidad varía entre machos y hembras,⁶² lo cual puede afectar el proceso de regeneración ósea; de 4 a 6 meses de edad por el grado de madurez ósea obtenida, para extrapolar

resultados a humanos que no comprometan los tejidos cercanos a la neoformación ósea y permitan obtener resultados confiables⁵ y de 2.5 a 3 kilogramos (kg), debido a que el sobrepeso puede relacionarse con factores metabólicos que influyen en el metabolismo óseo y en procesos de regeneración.⁶³ La zona a intervenir fue el hueso parietal de la calota de los conejos por considerarse la primera opción por su origen intramembranoso similar a la región mandibular en los humanos,⁶⁴ la accesibilidad a la zona y por el tamaño adecuado para crear defectos de tamaño crítico. Defectos de diferentes dimensiones ya han sido usados en estudios previos desarrollados en calota de conejos. Pero, en este estudio con el fin de crear defectos óseos de tamaño crítico, defectos que no se autoregeneran totalmente,⁶⁵ se crearon defectos óseos bilaterales circulares de 10 milímetros (mm) de diámetro que coinciden con muchos estudios que consideran que un defecto de tamaño crítico en calota de conejos está en un rango de 10 a 15 milímetros (mm) de diámetro.^{37, 66}

Así mismo, en el presente estudio se comparó la neoformación ósea de la membrana de PRF con biomateriales que son considerados Standar, en el caso de la membrana se utilizó membrana de colágeno (Geistlich BioGide®, Suiza), por contar con un respaldo científico de muchos años¹⁹ y al ser considerada una membrana adecuada para ser colocada sobre el área quirúrgica y servir como barrera protectora que impida que el tejido blando crezca rápidamente e invada el espacio que debe ser ocupado por el crecimiento lento del nuevo hueso⁶⁷. En el caso del sustituto óseo se utilizó,

el xenoinjerto (GeistlichBio Oss®, Suiza) considerado un Gold Standar en cirugía reconstructiva, como alternativa a usar un autoinjerto; sin embargo, su principal limitación es que solamente es osteoconductor y su asociación con la membrana de PRF le agregará propiedades osteoinductivas a través de las cuales hay una liberación lenta y gradual de factores de crecimiento, que proporcionan condiciones ideales para la regeneración ósea.^{44,68} Por ello, diversos estudios han determinado que el xenoinjerto (Geistlich Bio Oss®, Suiza) es un buen ejemplo de andamio para regeneración ósea, lo que resulta ser una alternativa bastante interesante por el hecho de trabajar en conjunto la membrana de PRF y el xenoinjerto (Geistlich Bio Oss®, Suiza) permitiendo agregar a las propiedades osteoconductoras del xenoinjerto, las citoquinas, y factores de crecimiento proporcionados por la membrana de PRF para inducir la proliferación y diferenciación celular promoviendo la regeneración ósea.⁴⁴

La literatura científica viene respaldando la utilización de la membrana de fibrina rica en plaquetas mezclado con biomateriales de relleno en sus diferentes presentaciones debido a que esto mejorará enormemente los procesos de regeneración y neoformación ósea en los defectos,^{24, 32} aunque en la presente investigación no se utilizó tal técnica de mezcla de biomateriales, se obtuvieron resultados favorables cuando se utilizaron de manera conjunta ambos biomateriales (membrana de PRF cubriendo el xenoinjerto) lo cual podría explicar los resultados obtenidos basados en las excelentes propiedades de la membrana de PRF para estimular la

regeneración ósea, lo cual nos abre una nueva ventana a la investigación científica de futuros estudios. Por ello, es notorio observar muy poca evidencia científica⁴⁸ utilizando sólo membrana de PRF en defectos óseos, pero una mayor evidencia de los beneficios de mezclar la membrana de PRF con otros biomateriales de relleno potenciando así el proceso de neoformación ósea. Así mismo, tenemos estudios donde se resalta el efecto positivo en la neoformación ósea resultado de la combinación de membrana de PRF y diversos sustitutos óseos. Lee et al.⁶⁹ han demostrado que éxitos clínicos son mejores usando autoinjerto con membrana de PRF que usando autoinjerto sólo. En otro estudio, autores investigaron el efecto de la membrana de PRF asociado o no con el xenoinjerto (Geistlich Bio Oss®, Suiza) en defectos de calota de ratas, de tamaño crítico de 5 milímetro de diámetro, en 48 ratas; ellos concluyeron que la membrana de PRF tiene un efecto positivo en la regeneración ósea sólo cuando está asociada con xenoinjerto (Geistlich Bio Oss®, Suiza)⁴⁴. Así mismo, Kökdere et al.⁷⁰ evaluaron la eficacia de la membrana de PRF asociada a injerto autógeno en defectos de tibia de conejos en diferentes intervalos de tiempo, encontrando mediante análisis histomorfométrico, una mayor neoformación ósea significativa en aquellos defectos tratados con membrana de PRF e injerto autógeno con respecto a los defectos controles mostrando así el efecto positivo de la membrana de PRF en la Regeneración ósea.

Como hemos observado, diversos autores han reportado que el uso de la membrana de PRF, sola, tiene una acción periodontal⁷¹ y en regeneración

ósea tiene excelentes resultados cuando está asociada con otros sustitutos óseos como xenoinjertos (Geistlich Bio Oss®, Suiza) o autoinjertos,^{37, 44, 72} similares resultados se encontraron a las cinco semanas donde la neoformación ósea en aquellos defectos tratados con membrana de fibrina rica en plaquetas fue mayor que los defectos controles y los defectos con xenoinjerto cubierto con membrana de colágeno, lo cual indica que a la cinco semanas en los conejos se puede observar procesos de remodelación ósea equivalente en humanos de 2 a 6 meses con niveles altos de neoformación ósea explicados en la liberación gradual de citoquinas y factores de crecimiento lo que mantiene el espacio adecuado y la vascularización para que en conjunto con las propiedades del sustituto óseo se lleve a cabo la neoformación ósea. Estos resultados son similares a lo encontrado por Yoon et al.³⁹ que evaluaron histomorfométricamente la influencia de la membrana de fibrina rica en plaquetas en la angiogénesis y osteogénesis en regeneración ósea usando xenoinjerto en defectos de calota de conejos. En este caso, encontraron que los defectos tratados con membrana de Fibrina Rica en Plaquetas aumentaron significativamente la vascularización lo cual resultó ser adecuado para el soporte del sustituto óseo en regeneración ósea.

Es claro observar, que las ventajas que posee la membrana de PRF en cuanto a neoformación ósea se debe en gran medida al gran concentrado de factores de crecimiento como PDGF, TGF- β , VEGF y proteínas morfogenéticas^{21, 22} los que juegan un rol importante en la hemostasia, angiogénesis, proliferación osteoblástica y diferenciación de las células.⁷⁰ Por ello, el uso de la membrana

de fibrina rica en plaquetas cubriendo los sustitutos óseos ofrece cuatro ventajas importantes. La primera, la membrana de fibrina rica en plaquetas juega un rol mecánico importante porque mantiene al sustituto óseo. La segunda, la matriz de fibrina facilita la regeneración con migración celular y la vascularización, permitiendo mantener juntas las partículas del sustituto óseo y proporcionar áreas adecuadas para la formación de nuevo hueso especialmente durante etapas temprana de regeneración ósea. La tercera, la liberación de citoquinas y factores de crecimiento son liberados gradualmente mientras la matriz de fibrina es reabsorbida permitiendo crear un proceso continuo de cicatrización. Finalmente, la presencia de leucocitos y citoquinas en la matriz de fibrina juegan un rol importante en la auto regulación de la inflamación e infección dentro de los sustitutos óseos.⁷⁰

Pues, por diversos estudios se comprueba que la membrana de fibrina rica en plaquetas mantiene las partículas juntas del sustituto óseo, el espacio adecuado para evitar infiltración de tejido permitiendo mayor estabilidad para que se lleve a cabo de forma adecuada el proceso de la regeneración ósea.⁷⁰

Basados en nuestros resultados, podemos demostrar que la membrana de PRF permite reparar defectos óseos y tener un efecto positivo en el proceso de regeneración ósea guiada cuando se usa como membrana cubriendo el sustituto óseo y de manera combinada con sustitutos óseos como el xenoinjerto aportando propiedades osteoinductivas que potencian este proceso de regeneración, permitiendo obtener resultados en cuanto a

neoformación ósea muy similares si utilizamos los biomateriales considerados como Gold Standar obteniendo mayor neoformación ósea debido a la liberación gradual de factores de crecimiento en aquellos defectos donde no se colocó nada. Así mismo, cabe señalar que este biomaterial es de bajo costo y que siguiendo un protocolo adecuado se puede obtener de manera fácil y sencilla de la propia sangre del paciente después de un proceso de centrifugación, convirtiéndose esta membrana de fibrina rica en plaquetas en una alternativa a ser utilizada cuando el costo de otras membranas no son accesibles para nuestros pacientes permitiendo lograr resultados tan iguales y hasta superiores en cuanto a neoformación ósea y acortar el periodo de tiempo de la rehabilitación en la zona del defecto óseo.

A pesar del efecto positivo que presenta la membrana de PRF, lo cual ha sido evidenciado científicamente, es necesario mencionar que los resultados obtenidos se deben a que las dimensiones y forma de los defectos creados en esta investigación ya han sido utilizados en diversos estudios como el de Delgado- Ruiz et al⁵, Meza et al⁴², Knapen et al⁴³ y de Ríos et al⁴⁵, en los cuales se siguió el protocolo establecido por la Guía de Osteología para Regeneración Oral y Maxilofacial, dada para modelos preclínicos; para ser realizado en animales de una escala filogenética menor como son los conejos y evaluar diversos procedimientos regenerativos con biomateriales.

Por ello, es que los resultados encontrados demuestran que no hay diferencia significativa entre los grupos experimentales y el control, y esto podría deberse a que la forma circular de los defectos con cuatro paredes y con las

dimensiones de 10mm de diámetro por 1.2mm de profundidad, son lo suficiente y potencialmente autoregenerables sin contar con presencia de biomaterial alguno como se observó en el grupo control.

Ante ello, se sugiere establecer nuevos consensos que sirvan de guía y que permitan desarrollar un adecuado modelo experimental en animales para probar procesos de neoformación ósea con diversos biomateriales.

La extrapolación de resultados obtenidos en animales de experimentación a la especie humana siempre resulta discutible, especialmente cuando está comprobado que el proceso de regeneración ósea es más rápido en estos animales y se requiere mayor cantidad de estudios; sin embargo, el periodo de observación de las variables a las tres y cinco semanas fue determinado y basado en lo que sostienen muchos autores que con este tiempo se puede observar procesos tempranos de regeneración ósea y evaluar el potencial de los biomateriales.

La importancia de esta investigación no sólo radica en los resultados encontrados, sino en la metodología utilizada, siendo netamente cuantitativa con un gran valor científico, a través del uso de la técnica histomorfométrica ósea, que nos ofrece resultados sencillos y precisos a tomar en cuenta cuando deseamos mediciones con respecto a neoformación ósea.

Finalmente, se sugiere realizar mayor cantidad de estudios donde la obtención de la membrana de PRF siga un protocolo adecuado de manipulación y

centrifugación; ya que, ahí radica su efectividad. En este sentido se sugiere evaluar su efecto con otros biomateriales por periodos más largos para que en el futuro se pueda extrapolar resultados sin problemas con una técnica mínimamente invasiva y con resultados clínicos bastante favorables en cuanto a neoformación ósea ante defectos de tamaño crítico.

IX. CONCLUSIONES

- 1.** La densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubierto con fibrina rica en plaquetas fue mayor que los defectos controles a las tres semanas, sin significancia estadística.
- 2.** La densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubierto con fibrina rica en plaquetas fue menor que los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno a las tres semanas, sin significancia estadística.
- 3.** La densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubierto con fibrina rica en plaquetas fue mayor significativamente que los defectos controles a las cinco semanas.
- 4.** La densidad de la neoformación ósea en los defectos tratados con xenoinjerto cubierto con fibrina rica en plaquetas fue mayor que los defectos tratados con xenoinjerto cubiertos con membrana de colágeno a las cinco semanas, sin significancia estadística.

X. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar un nuevo consenso que sirva de guía para futuras investigaciones de las dimensiones adecuadas y forma que debe tener los defectos óseos para investigar de neoformación con biomateriales.
2. Realizar mayores investigaciones utilizando esta membrana de Fibrina Rica en Plaquetas cubriendo diferentes sustitutos óseos y no utilizándola con la técnica de mezcla de biomateriales, para poder comprobar el efecto positivo que tiene esta membrana de PRF en el proceso de neoformación ósea.
3. Realizar nuevas investigaciones evaluando las excelentes propiedades de esta membrana de PRF en el proceso de neoformación ósea mediante técnicas cuantitativas donde no sólo evaluemos densidad ósea, sino longitud, volumen y reabsorción de biomaterial.
4. Utilizar otras técnicas para evaluar neoformación ósea como análisis radiográficos, densitometría o evaluación tomográfica.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta E, Andrade L. Aplicación de fibrina rica en plaquetas en la movilidad dental ortodóntica post exodoncia en conejos. [Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista]. Venezuela: Universidad de Crabobo. Facultad de Odontología; 2015.
2. Guadilla Gonzáles Y. Estudio de diferentes modelos de Regeneración ósea Guiada previa a la colocación de Implantes Dentales Oseointegrados. [Tesis Doctoral]. Salamanca: Universidad de Salamanca. Facultad de Odontología; 2010.
3. Monje A, Chan HL, Galindo-Moreno P, Elnayef B, Suarez-Lopez Del Amo F, Wang F, Wang HL. Alveolar Bone Architecture: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol.* 2015; 86(11):1231-48.
4. Martino MM, Briquez PS, Maruyama K, Hubbell JA. Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Nov 1; 94:41-52.
5. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2014; 1–16.
6. Basselt CA, Campbell JB, Girado JM, Rossi JP. Application of monomolecular filter tubes in bridging gaps in peripheral nerves and for prevention of neuroma formation, a preliminary report. *J Neurosurg.* 1956; 13: 635-37.
7. De Oliveira M, Olate S, Pozeer L, Vasquez B, Cantin M, Albergaria-Barbosa JR. Reparación ósea utilizando sulfato de calcio en defectos óseos de tibia de conejos. *Int. J. Morphol.* 2014; 32(4):1472-76.
8. Suenaga H, Furukawa KS, Suzuki Y, Takato T, Ushida T. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26 (11):254.
9. Saad KA, Abu-Shahba AG, El-Drieny EA, Khedr MS. Evaluation of the role of autogenous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation

- for the repair of mandibular bone defects in rabbits. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015; 43 (7):1151-60.
10. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med.* 2012; 26(10):81.
 11. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014; 14(1):15-56.
 12. Turri A, Dahlin C. Comparative maxillary bone-defect healing by calcium-sulphate or deproteinized bovine bone particles and extra cellular matrix membranes in a guided bone regeneration setting: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(5):501-6.
 13. Li W, Ma G, Brazile B, Li N, Dai W, Butler JR, Claude AA, Wertheim JA, Liao J, Wang B. Investigating the Potential of Amnion-Based Scaffolds as a Barrier Membrane for Guided Bone Regeneration. *Langmuir.* 2015; 31(31):8642-53.
 14. Benic GI, Hämmerle CH. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000.* 2014; 66(1):13-40.
 15. Klin-Wasmer C, Rutjes AW, da Costa BR, Salvi GE, Jüni P, Sculean A. Absorbable collagen membranes for periodontal regeneration: a systematic review. *J Dent Res.* 2013; 92(9):773-81.
 16. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J.* 2014; 16(8):56-65.
 17. Stoecklin-Wasmer C, Rutjes AW, da Costa BR, Salvi GE, Jüni P, Sculean A. Absorbable collagen membranes for periodontal regeneration: a systematic review. *J Dent Res.* 2013; 92(9):773-81.
 18. Vanden Bogaerde L. Rigenerazione ossea guidata con membrane riassorbibili. *Dental Cadmos.* 2000; 4: 37-55.
 19. Chattopadhyay S, Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers.* 2014; 101(8):821-33.

20. De Santis E, Lang NP, Favero G, Beolchini M, Morelli F, Botticelli D. Healing at mandibular block-grafted sites. An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(5):516-22.
21. Dohan Ehrenfest DM, Choukroun J, Diss A, Dohan S, Dohan A, Mouhyi J y col. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101:E37-44.
22. Del Corso M, Toffler M, Dohan Ehrenfest DM. Use of an autologous Leukocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) Membrane post avulsión sites: an overview of Choukroun's PRF. *The Journal of Implant and Advanced Clinical Dentistry.* 2010; 1(9): 27-35. http://www.nxtbook.com/nxtbooks/specops/jiacd_200912/index.php?startid=27.
23. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol.* 2010; 81(4): 546-55.
24. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxilofacial surgery. Part 2: bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13:1231-56.
25. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101:45-50.
26. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101:51-5.
27. Madurantakam P, Yoganarasimha S, Hasan FK. Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, A Novel Biomaterial. *J Vis Exp.* 2015; 29(104).
28. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin

- (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors* 2009; 27:63–9.
29. Sanz M, Vignoletti F. Key aspects on the use of bone substitutes for bone regeneration of edentulous ridges. *Dent Mater.* 2015; 31(6):640-7.
 30. Balin VN, Balin DV, Iordanishvili AK, Musikin MI. [Osteostimulating effect of bone xenograft on bone tissue regeneration]. *tomatologiya (Mosk).* 2015; 94(2):5-9.
 31. Veis A, Dabarakis N, Koutrogiannis C, Barlas I, Petsa E, Romanos G. Evaluation of Vertical Bone Regeneration Using Block and Particulate Forms of Bio-Oss Bone Graft: A Histologic Study in the Rabbit Mandible. *J Oral Implantol.* 2015; 41(3):66-72.
 32. Kumar YR, Mohanty S, Verma M, Kaur RR, Bhatia P, Kumar VR, Chaudhary Z. Platelet-rich fibrin: the benefits. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 9.
 33. Bölükbaşı N, Yenyol S, Tekkesin MS, Altunatmaz K. The use of platelet-rich fibrin in combination with biphasic calcium phosphate in the treatment of bone defects: a histologic and histomorphometric study. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2013; 75:15-21.
 34. Ramírez P. Modelo experimental de la respuesta ósea a implantes y la melatonina: Estudio radiológico e histomorfométrico. [Tesis]. España: Universidad de Murcia. Facultad de Medicina y Odontología; 2009.
 35. Ribeiro N, Sousa SR, van Blitterswijk CA, Moroni L, Monteiro FJ. A biocomposite of collagen nanofibers and nanohydroxyapatite for bone regeneration. *Biofabrication.* 2014; 6(3):035015.
 36. Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal VR. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J Conserv Dent.* 2013; 16(4):284-93.
 37. Pripatnanont P, Nuntanarant T, Vongvatcharanon S, Phurisat K. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013; 41(8):e191-200.
 38. Yilmaz D, Dogan N, Ozkan A, Sencimen M, Ora BE, Mutlu I. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. *Acta Cir Bras.* 2014; 29(1):59-65.

39. Yoon JS, Lee SH, Yoon HJ. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014; 42(7):1071-7.
40. Pelegrine AA, Aloise AC, Zimmermann A, de Mello E Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clin Oral Implants Res.* 2014 May; 25(5):567-72.
41. Acar AH, Yolcu Ü, Gül M, Keleş A, Erdem NF, Altundag Kahraman S. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol.* 2015 Apr; 60(4):606-14.
42. Meza E, Correa E, Soto D & Ríos L. Bone neoformation in defects treated with platelet-rich fibrin membrane versus collagen membrane: a histomorphometric study in rabbit femurs. *J Oral Res* 2015; 4(1):32-37.
43. Knapen M, Gheldof D, Drion P, Layrolle P, Rompen E, Lambert F. Effect of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) on bone regeneration: a study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2015 Jan; 17 Suppl 1:e143-52.
44. Oliveira MR, deC Silva A, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR Jr, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 May; 44(5):649-55.
45. Ríos L, Espinoza C, Alarcon M, Huamani J. Bone density of defects treated with lyophilized amniotic membrane versus collagen membrane: a tomographic and histomorphometric study in a rabbit's femur. *J. Oral Res.* 2014; 3(3): 143-49.
46. Sanzana Salamanca ES. Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutos óseos en defectos cavitarios experimentales [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona. Facultad de Estomatología; 2004.

47. Fuentes Paredes F, Mendoza Yanavilca RA, Rivera Rodriguez R, Vara Márquez MD. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejos. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2010.
48. Meza J, LeccaM, Correa E, Ríos K. Platelet Rich Fibrin and its application in Periodontics: a review of literatura. Rev. Estomatol Herediana. 2014; 24(4): 287-93.
49. Mohammad Hamdam AA. Bioactividad de cementos fosfatos cálcicos sustituidos con estroncio y su aplicación en regeneración ósea. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Estomatología; 2008.
50. Fernández Sierra L. Evaluación de la regeneración ósea *in vivo* de cerámicas de HAp activadas con PRP y quitosano/rhBMP-2. [Tesis de Maestría]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Odontología; 2013-2014.
51. Díaz-Ropeno E. Regeneración ósea vertical a base de cementos de Brushita. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad de Rey Juan Carlos; 2012.
52. Kim TH, Kim SH, Sándor GK, Kim YD. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. Arch Oral Biol. 2014; 59(5):550-8.
53. Soares F, Alencar LM, Dantas J, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Enxerto Bovino Organico asociado ao PRP en calvaria de coelhos. Arq Int Otorrinolaringol. 2011; 15(2): 208-13.
54. Lappalainen OP, Korpi R, Haapea M, Korpi J, Ylikontiola LP, Kallio-Pulkkinen S, Serlo WS, Lehenkari P, Sándor GK. Healing of rabbit calvarial critical-sized defects using autogenous bone grafts and fibrin glue. Childs Nerv Syst. 2015; 31(4):581-7.
55. Veríssimo DM, Leitão RF, Figueiró SD, Góes JC, Lima V, Silveira CO, Brito GA. Guided bone regeneration produced by new mineralized and reticulated collagen membranes in critical-sized rat calvarial defects. Exp Biol Med (Maywood). 2015; 240(2):175-84.

56. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:421746.
57. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Mar 1; 11(2):151-7.
58. Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 85: 206–17.
59. Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Choi SH. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci*. 2010; 40(4):180-7.
60. Zhao MD, Huang JS, Zhang XC, Gui KK, Xiong M, Yin WP, Yuan FL, Cai GP. Construction of Radial Defect Models in Rabbits to Determine the Critical Size Defects. *PLoS One*. 2016 Jan 5; 11(1).
61. Nieves, J.W., Formica, C., Ruffing, J., Zion, M., Garrett, P., Lindsay, R. & Cosman, F. Males have larger skeletal size and bone mass than females, despite comparable body size. *J Bone Miner Res*. 2005 Mar;20(3):529-35.
62. Garner, E., Lakes, R., Lee, T., Swan, C. & Brand, R. Viscoelastic dissipation in compact bone: implications for stress- induced fluid flow in bone. *J Biomech Eng*. 2000 Apr;122(2):166-72.
63. Guo, S. & Dipietro, L.A. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010 Mar; 89(3): 219–29.
64. Xu W, Spilker G, Weinand C. Methodological Consideration of Various Intraosseous and Heterotopic Bone Grafts Implantation in Animal Models. *J Tissue Sci Eng*. 2015; 6(3): 161
65. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; 205:299-308.

66. Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Choi SH. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci.* 2010; 40(4):180-7.
67. Hwang JW, Kim S, Kim SW, Lee JH. Effect of Extracellular Matrix Membrane on Bone Formation in a Rabbit Tibial Defect Model. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:6715295.
68. Li Q, Pan J, Danjaria SJ, Gopinathan G, Kolokythas A, Chu S, et al. Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:638043.
69. Lee HJ, Choi BH, Jung JH, Zhu SJ, Lee SH, Huh JY, et al. Maxillary sinus floor augmentation using autogenous bone grafts and platelet-enriched fibrin glue with simultaneous implant placement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103:329-33.
70. Kökdere NN, Baykul T, Findik Y. The use of platelet-rich fibrin (PRF) and PRF-mixed particulated autogenous bone graft in the treatment of bone defects: An experimental and histomorphometrical study. *Dent Res J* 2015; 12:418-24.
71. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, Quirynen M. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2017; 44: 67–82.
72. Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo AM, Scacco S, Inchingolo AD, et al. Trial with platelet-rich fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillar bone atrophy: clinical and radiological evaluations. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14:1075–84.

XII. ANEXOS

Anexo 1

COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS	
(Se pretende comparar si las medias son diferentes)	
Indique número del tipo de test	
Tipo de test (unilateral o bilateral)	2 BILATERAL
Nivel de confianza o seguridad (1- α)	95%
Poder estadístico	50%
Precisión (d) (Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar, datos cuantitativos)	2.41
Varianza (S^2) (De la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia)	5.61
TAMAÑO MUESTRAL (n)	7

- Los datos obtenidos de la prueba piloto se reemplazaron en esta fórmula de COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS y se obtuvo un tamaño muestral de 7 para cada grupo experimental, tomándose un total de 14 conejos.

Anexo 2

MEMBRANA DE COLÁGENO (GEISTLICH BIOGIDE® , SUIZA) GOLD ESTÁNDAR-BARRERA

Membrana de colágeno bicapa biocompatible, estéril y reabsorbible para la regeneración ósea y tisular guiada.

COMPOSICIÓN

- Membrana pura de colágeno obtenida mediante procesos de fabricación estandarizados y controlados.
- El colágeno se extrae de ganado porcino con certificado veterinario y es purificado meticulosamente para evitar reacciones antigénicas.



PROPIEDADES

- Biocompatibilidad
- Consistencia adecuada para actuar como barrera biológica.
- Fácil manipulación clínica.

VENTAJAS

Actúa como una excelente barrera biológica e impide el crecimiento de tejido fibroso favoreciendo la regeneración ósea, comparado con la utilización de únicamente un sustituto óseo.

Anexo 3

XENOINJERTO (GEISTLICH BIO OSS[®], SUIZA) GOLD ESTÁNDAR

Mineral de hueso natural para injertos óseos.

COMPOSICIÓN

- Mineral de hueso natural de origen bovino.
- Es una estructura mineral osteoconductora altamente purificada.
- La esterilización se realiza por radiación gamma.



PROPIEDADES

- Estructura macroporosa y microporosa similar a la del hueso esponjoso humano.
- Biocompatibilidad.
- Excelente alternativa al hueso autógeno en defectos óseos.

VENTAJAS

Excelente sustituto óseo con gran respaldo científico para ser utilizado como andamio para procesos de regeneración óseos en defectos de gran tamaño por sus notables propiedades osteoconductoras.

Anexo 4: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	VALORES
BIOMATERIAL DE RELLENO	Biomateriales utilizados para el proceso de regeneración ósea guiada	Xenoinjerto con distintos tipos de membrana de recubrimiento.	Características del biomaterial	Cualitativa	Nominal	Membrana de Colágeno (Biogide) más xenoinjerto Membrana de Fibrina Rica en Plaquetas (PRF) más xenoinjerto (Bio Oss) Control

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	VALORES
<p>DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA</p>	<p>Tejido óseo neoformado en el defecto óseo.</p>	<p>Área trabecular total que corresponde al tejido óseo neoformado en el defecto óseo.</p>	<p>Número de cruces que inciden dentro de las trabéculas óseas expresadas en porcentaje.</p>	<p>Cuantitativa</p>	<p>De razón</p>	<p>Porcentual (0-100%)</p>

COVARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	CATEGORÍAS
TIEMPO	Período comprendido entre el inicio y final de un evento	Período comprendido entre la fecha de colocación del biomaterial y las fechas de evaluación programadas	Cantidad de semanas entre la fecha de colocación del biomaterial y las fechas de evaluación	Cualitativa	Ordinal	Tercera semana Quinta semana

ANEXO 8

INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA



Fig. 1. Adquisición de conejos



Fig. 2. Aclimatación de animales



Fig. 3. Peso de los conejos



Fig. 4. Anestesia



Fig. 5. Razurado de zona quirúrgica



Fig. 6. Antisepsia



Fig. 7. Incisión



Fig. 8. Decolado



Fig. 9. Trefinas (Neodent®)



Fig. 10. Creación de defectos óseos

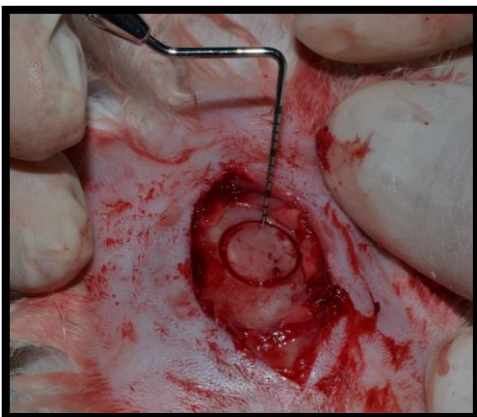


Fig. 11. Profundidad de 1.5mm

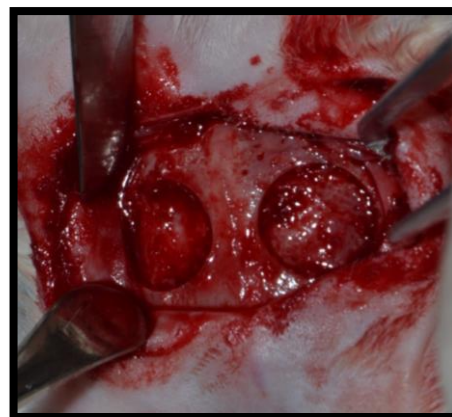


Fig. 12. Dos defectos óseos creados



**Fig. 13. Defecto experimental
Xenoinjerto + MC**



**Fig. 14. Extracción de sangre
(vena safena)**

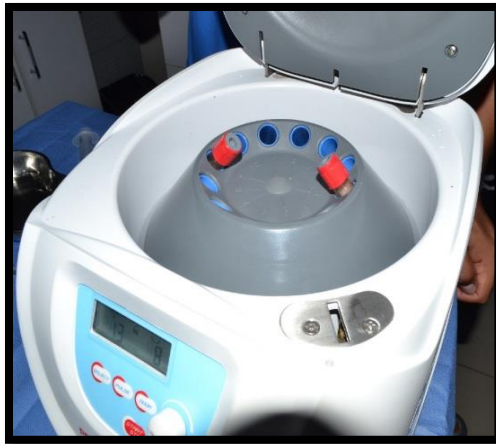


Fig. 15. Centrifugado de sangre



Fig. 16. Extracción de Fibrina



**Fig. 17. Defecto experimental
Xenoinjerto + PRF**

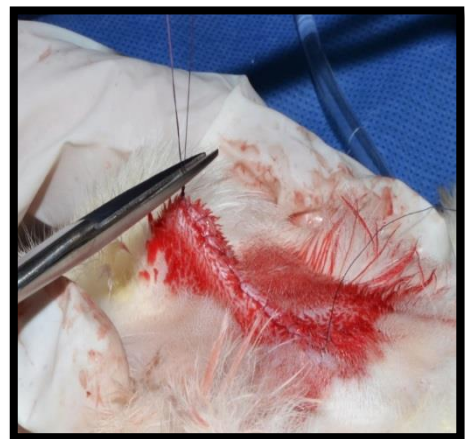


Fig. 18. Sutura



Fig. 19. Postoperatorio



Fig. 20. Sacrificio



Fig. 21. Extracción del espécimen ósea

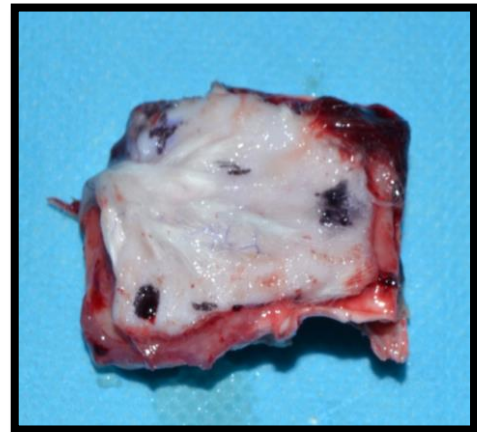


Fig. 22 . Especimen ósea

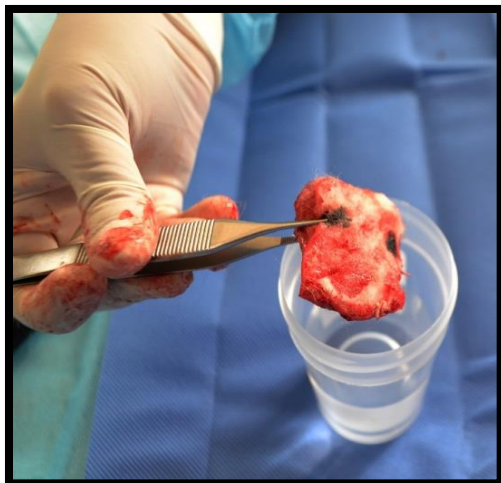


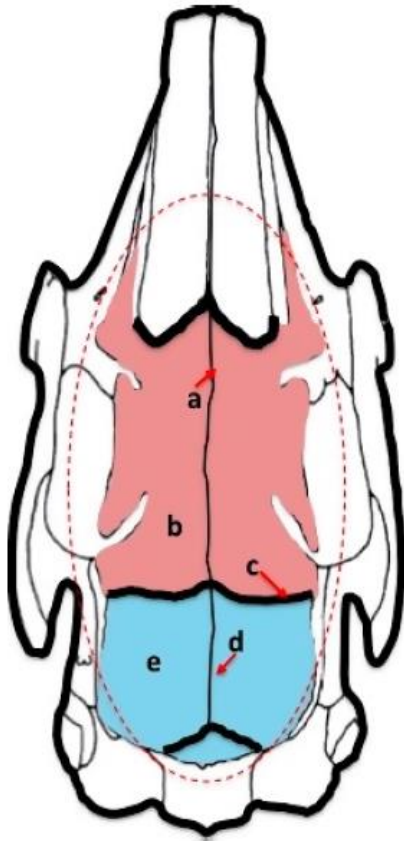
Fig. 23. Especimen óseo en formol al 10%



Fig. 24. Láminas histológicas obtenidas

Anexo 9

PUNTOS DE REFERENCIA EN LA CALOTA DEL CONEJO



- a. SUTURA INTERFRONTAL
- b. HUESO FRONTAL
- c. SUTURA FRONTOPARIETAL
- d. SUTURA INTERPARIETAL
- e. HUESO PARIETAL

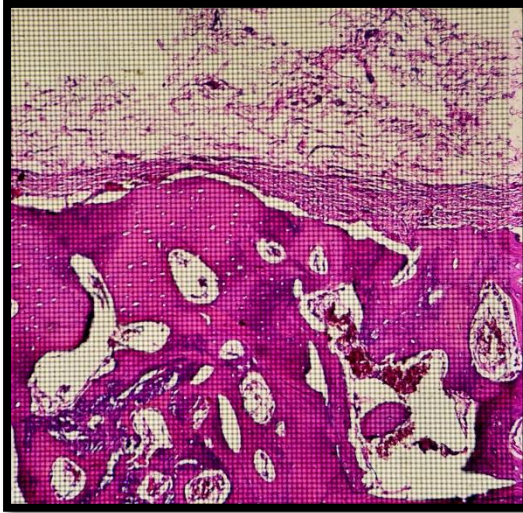


Anexo 10

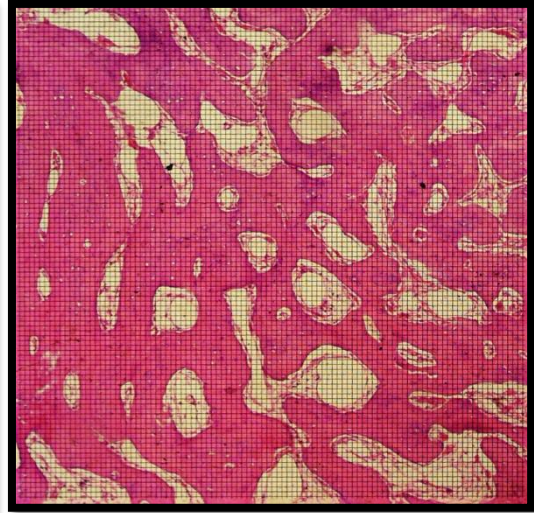
REGISTROS DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO

BIOMATERIAL QUE SE COLOCÓ	CÓDIGO (4 NÚMEROS AL AZAR)	FECHA DE SACRIFICIO
MR	4209	03
MA	3902	05

Anexo 11



**Fig. 1. Grupo Control
Coloración HE. 10X**



**Fig. 2. Grupo Fibrina Rica en
Plaquetas
Coloración HE. 10X**



**Fig. 2. Grupo Membrana de
colágeno
Coloración HE. 10X**

Anexo 12

**DATOS DEL ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO
(TÉCNICA DE HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA)**

BIOMATERIAL QUE SE COLOCÓ	CÓDIGO (4 NÚMEROS AL AZAR)	FECHA DE SACRIFICIO	CONTEO DE PUNTOS	DENSIDAD DE LA NEOFORMACIÓN ÓSEA
MT	3985	03	2896	87%

**CONTEO DIFERENCIAL DE PUNTOS
(DENSIDAD ÓSEA %)**

DEFECTO ÓSEO CON XENOINJERTO	10000	⇒	100%
CUBIERTO CON MEMBRANA	A	⇒	X%
X= DENSIDAD DE HUESO NEOFORMADO(%)			

DEFECTO CONTROL	10000	⇒	100%
	A	⇒	X%
X= DENSIDAD DE HUESO NEOFORMADO(%)			