

Eficacia de la membrana amniótica liofilizada como barrera en la regeneración ósea guiada en tibias de conejos*

Effectiveness of lyophilized amniotic membrane as barrier in guided bone regeneration in rabbit tibias

Jusef Yábar Condori ¹
 Yuri Castro Rodríguez ²
 Sixto Grados Pomarino ³
 Katia Medina Calderón ⁴
 Emma Castro Gamero ⁵

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la membrana amniótica liofilizada usada como barrera biológica en el proceso de regeneración ósea guiada en tibias de conejos. Materiales y métodos: se utilizaron 10 conejos de raza Nueva Zelanda de 2 a 2.5 Kg y de 4 a 6 meses de edad, en los cuales se crearon defectos circulares óseos de 4mm de diámetro en la región más inferior de las extremidades posteriores del conejo (tibias). Se formaron 2 grupos, el de control (no se colocó membrana) y el experimental (se colocó membrana amniótica liofilizada como barrera). Los animales fueron sacrificados a las 6 semanas de la cirugía, realizándose un análisis clínico, radiológico e histológico de la zona donde se crearon los defectos óseos. Resultados: clínicamente se observó ausencia de reacción inflamatoria (100%) y de procesos infecciosos (100%), al examen histológico un 87.5% de las muestras del grupo de estudio mostró presencia de hueso maduro compacto mientras que en el grupo control se reportó un 100% de ausencia del mismo. Conclusión: la regeneración ósea fue significativamente mayor en los defectos cubiertos con membrana amniótica liofilizada comparada con las muestras del grupo control.

PALABRAS CLAVE

Regeneración ósea guiada, membrana amniótica humana, defectos óseos.

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of lyophilized amniotic membrane used as a biological barrier in the process of guided bone regeneration in rabbit tibias. Materials and Methods: Were used 10 New Zealand white rabbits of 2 to 2.5 Kg and 4–6 months of age; in which circular bone defects of 4mm in diameter were created in the lower region of the rabbit hind limb (tibias). 2 groups were formed: a control group (no membrane was placed) and the experimental group (lyophilized amniotic membrane was placed as a barrier). The animals were sacrificed at 6 weeks after surgery, performing a clinical, radiological and histological analysis of the area where the bone defects were created. Results: Clinically was found an absence of inflammatory reaction (100%) and absence of infectious processes (100%), in the histological examination, 87.5% of the samples of the study group showed the presence of mature compact bone while in the group control reported a 100% absence. Conclusion: We concluded that bone regeneration was significantly higher in the defects covered with lyophilized amniotic membrane compared with the samples from the control group.

KEY WORDS

Guided bone regeneration, human amniotic membrane, bone defects.

* Artículo de investigación e innovación resultado de procesos de investigación. Producto de la investigación realizada para optar por el grado de bachiller en Odontología, por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú-. No se contó con financiamiento para la realización del proyecto de investigación.

- 1 Cirujano dentista, Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Dirección postal: Marina de Guerra del Perú – Lima. Correo electrónico: jusefyc@hotmail.com
- 2 Estudiante del pregrado de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Dirección: Jr. Tomás Catari 463, Urb. El Trébol. Dpto. 201. Los Olivos. Lima- Perú. Correo electrónico: yuricastro_16@hotmail.com
- 3 Coordinador de la Especialidad de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Dirección postal: Picho 124 Mananga San Miguel. Correo electrónico: sixtogo@gmail.com
- 4 Docente del Departamento de Estomatología preventiva y social de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Dirección postal: Jr. Eloy Reategui 840 San Germán Lima 31. Correo electrónico: medina.katia@gmail.com
- 5 Banco de tejidos, Instituto de Salud del Niño. Dirección postal: Piedra Lima. Correo electrónico: ecastrog@hotmail.com

Citación sugerida

Yábar J, Castro Y, Grados S, *et al.* Eficacia de la membrana amniótica liofilizada como barrera en la regeneración ósea guiada en tibias de conejos. *Acta Odontológica Colombiana* [en línea] 2014, [fecha de consulta: dd/mm/aaaa]; 4(1): 81-90. Disponible desde: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actaodontol>

Recibido	23 de agosto de 2013
Aprobado	19 de mayo de 2014
Publicado	30 de junio de 2014

Introducción

La regeneración ósea guiada (ROG) es una secuencia lógica y natural de los principios creados con base en la regeneración tisular guiada (RTG), conseguida con el objetivo de complementar la terapia periodontal reconstruyendo los efectos causados por la periodontitis en el aparato de inserción del diente (1, 2).

La RTG tuvo resultados positivos que aprobaron la técnica cuando fue estudiada en animales. Los estudios clínicos en humanos confirmaron los resultados obtenidos en animales y su uso en periodoncia pasó a ser rutina en aquellos casos en los cuales estaba indicada la técnica. El éxito de esta técnica, basada en la promoción de nuevo ligamento periodontal y lógicamente de cemento y hueso, despertó la atención de los investigadores interesados en conseguir un aumento de hueso en otras situaciones clínicas (3, 4).

Es así que nació la regeneración ósea guiada (ROG), ésta se fundamenta en la utilización de sistemas de barrera mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo con la intención de evitar el crecimiento de tejidos con capacidad de reparación rápida, como el tejido conectivo, que interfieren con el potencial osteogénico del defecto (5). La membrana utilizada en nuestro estudio fue una lámina de amnios liofilizada. La membrana amniótica es una membrana resistente, transparente, delgada y rica en colágeno que reviste la lámina coriónica y la placenta en el período del desarrollo fetal, muy similar a la piel. La membrana amniótica no tiene conductos sanguíneos, conexiones nerviosas ni canales linfáticos. El grosor del amnios puede variar entre 0.02 a 0.4 mm y consta de cinco capas: epitelio, membrana basal, capa compacta, capa fibroblástica y capa esponjosa. Esta "membrana amniótica liofilizada", hasta la actualidad ha sido utilizada por los especialistas de Cirugía Plástica y de Oftalmología, en el tratamiento de pacientes quemados y reconstrucciones de córnea respectivamente (6).

Mediante esta investigación estamos tratando de introducir el uso de la membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea guiada. Su objetivo general fue determinar la eficacia de la membrana amniótica liofilizada en el proceso de regeneración ósea guiada en defectos óseos producidos en las tibias de conejo. Planteamos la hipótesis que la membrana amniótica liofilizada posee la capacidad de actuar como barrera biológica y evitar la proliferación de tejido epitelial para facilitar la regeneración ósea guiada.

Materiales y métodos

Se utilizaron 10 Conejos raza Nueva Zelanda de 4 a 6 meses de edad aproximadamente de entre 2 – 2.5 Kg. de peso. Se seleccionó una muestra no probabilística pues el estudio que se plantea es un estudio exploratorio que busca indagar sobre el accionar de un nuevo biomaterial. Los animales de experimentación fueron enjaulados en grupos de 5 animales de manera clásica, el primer grupo fue el grupo control y el segundo el grupo experimental, ambos grupos fueron alimentados con comida tradicional de conejo más agua.

Después del periodo de aclimatación los animales fueron preparados para la implantación quirúrgica del material en estudio. Se retiró el agua y comida 12 horas antes de la intervención. Se procedió a realizar la depilación de la zona de trabajo (región tibial). La inducción anestésica se realizó por vía intramuscular (IM) con la administración de clorhidrato de ketamina (35 a 50 mg / kg) más

clorhidrato de xilacina (5 a 10 mg / kg), el nivel de anestesia fue controlado con ketamina intramuscular (IM). El fallecimiento y el mantenimiento de la anestesia fueron controlados mediante la pérdida del reflejo pupilar, ausencia o presencia de movimientos respiratorios y la relajación del músculo esquelético de la zona quirúrgica.

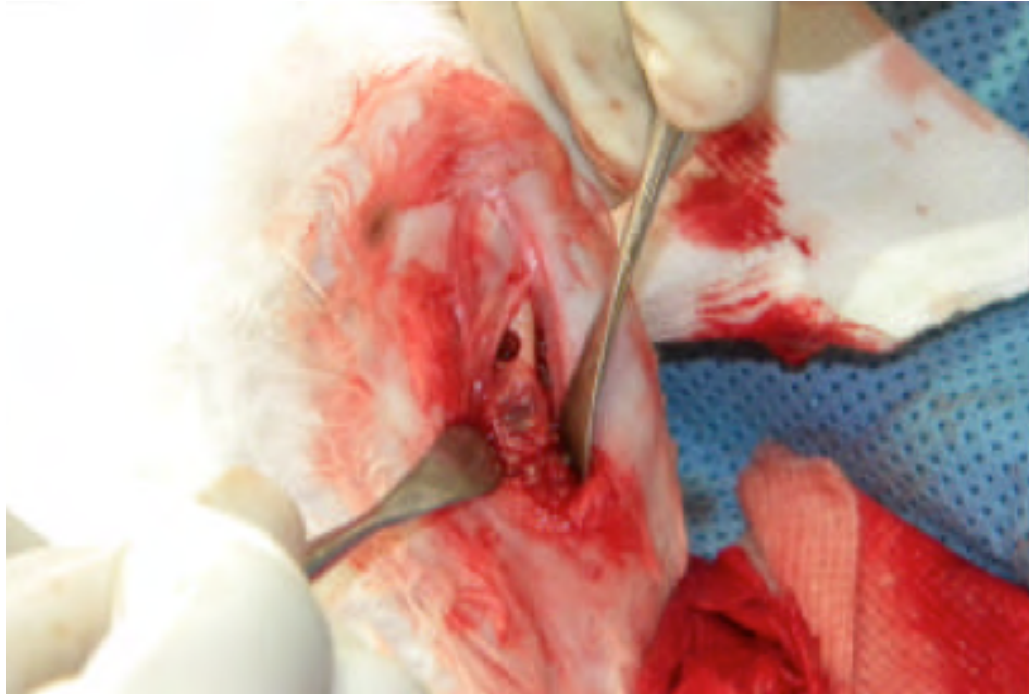
Después de la anestesia, el sitio quirúrgico trabajado fue la región más baja de las extremidades posteriores (tibias), se procedió a colocar anestesia local (Lidocaína 2%), se realizó una incisión de 7 cm en la superficie media de la tibia extendiéndose hasta el periostio; luego se realizó el levantamiento del colgajo dejando el hueso expuesto. Se utilizó un sistema de fresas para la preparación de cavidades para implantes cilíndricos de 4mm de diámetro (Figura 1), se procedió a colocar el material de investigación (Membrana amniótica liofilizada) para cubrir la entrada de los defectos (membranas de 1cm²) (Figura 2). La membrana utilizada en nuestro estudio fue una lámina de amnios liofilizada y esterilizada con rayos gamma, la cual fue donada por el Banco de Tejidos del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSS), institución encargada de la producción de este biomaterial con la ayuda del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN). La membrana amniótica fue recolectada de los amnios de pacientes recién nacidos.

Figura 1. Defectos óseos de 4 mm de diámetro, en cada tibia se realizaron 2 perforaciones una como área de estudio y la otra como área control



Fuente: fotografía tomada por los autores

Figura 2. Grupo experimental (colocación del material en estudio) vs Grupo control negativo (no se colocó ningún tipo de barrera)



Fuente: fotografía tomada por los autores

Se seleccionó las tibias de los conejos pues su fácil acceso y perforación durante el acto quirúrgico facilitan el manejo y colocación de la membrana amniótica. En cada tibia se tuvo 2 sitios de osteotomía, el primer sitio en cada tibia fue el control negativo, el sitio restante fue cubierto con el material de experimentación. Se procedió a suturar todos los planos, los más profundos con hilo reabsorbibles (catgut crómico 5 ceros) y los más superficiales con seda negra 3 ceros (5).

Se esperó un período de 6 semanas de cicatrización. Pasadas las 6 semanas, se procedió a sacrificar a los conejos con una dosis de 60 mg/kg de pentobarbital sódico (7). Para el análisis histológico las muestras de las tibias fueron fijadas en formol al 10% durante 24h. Posteriormente fueron sumergidas en ácido clorhídrico al 10% durante 2 semanas y luego en ácido nítrico al 10% durante 1 semana para completar el proceso de descalcificación. Después se realizó cortes y se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E). Por último, se observaron al microscopio óptico para determinar el proceso de regeneración ósea guiada (7).

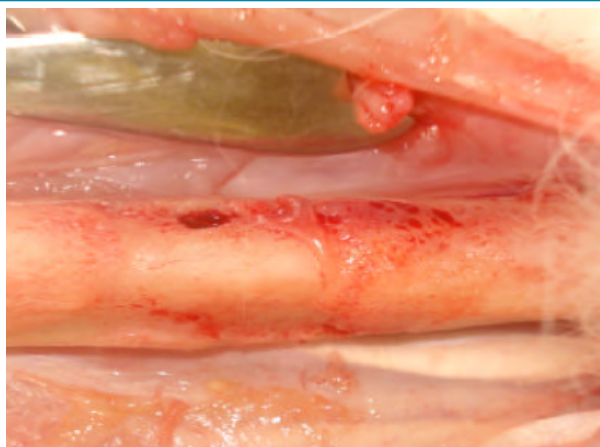
Para el análisis radiográfico se tomó una radiografía periapical de cada zona operada y se valoró utilizando la escala descrita por Taguchi y col (8): GRADO I imagen completamente radiolúcida, GRADO II imagen parcialmente radiolúcida, GRADO III imagen con patrón de trabeculado mandibular normal, GRADO IV imagen parcialmente radiopaca y GRADO V imagen completamente radiopaca.

Resultados

La recolección de datos se realizó con base en tres parámetros: clínicos, radiográficos e histológicos, evaluados en todos los especímenes. En la reentrada clínica se observó el grado de inflamación y se tomó la radiografía pertinente para realizar el análisis radiográfico. De un total de 20 muestras tanto las del grupo de estudio como las del grupo control, se observó clínicamente en todas la ausencia de reacción inflamatoria (100%), así como ausencia de procesos infecciosos (100%), la presencia de tejido duro que llenó el defecto se encontró en el 80% de las muestras del área de estudio, mientras que en el área control se observó clínicamente la presencia de tejido blando (tejido adiposo) que llenó el defecto óseo en el 80% de las muestras (ver cuadro 1 y figura 3).

Después de tomar las radiografías pertinentes se clasificaron los resultados según los criterios utilizados por Taguchi A. y col (8), se observó que el 62.5% de las muestras del grupo de estudio presentaron GRADO IV en relación al patrón del trabeculado, mientras que en el grupo control el 62.5% de las muestras presentaron GRADO II (ver cuadro 2 y figura 4).

Figura 3. Imagen clínica de las áreas de estudio y trabajo después de 6 semanas de cicatrización.



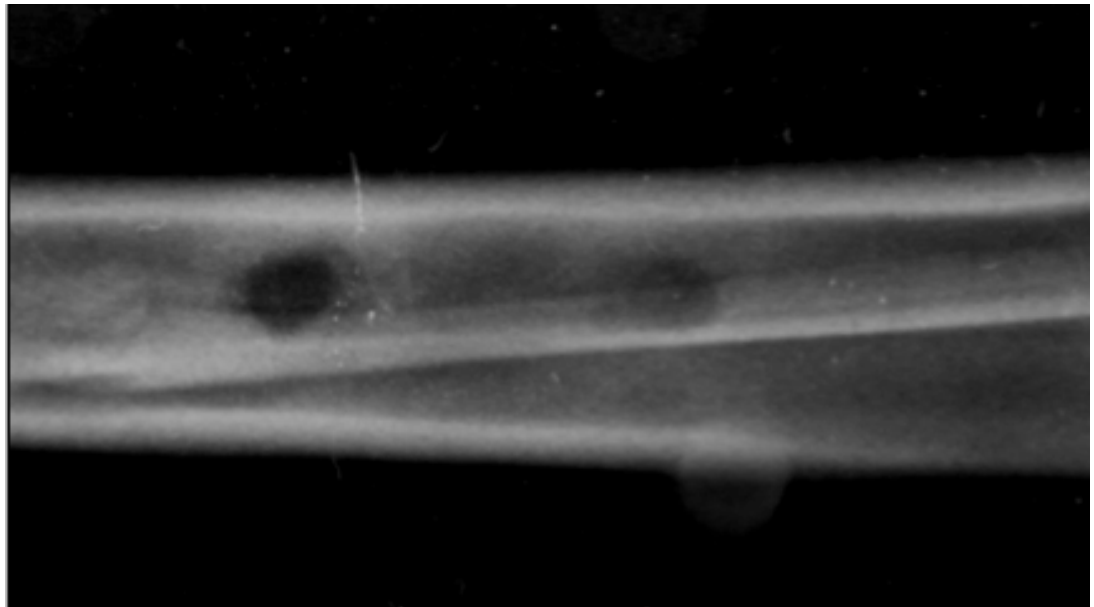
Fuente: fotografía tomada por los autores

Cuadro 1. Efecto clínico, después de 6 semanas de cicatrización, observado a nivel del área de estudio y área de control

Efecto clínico	Grupo de estudio				Grupo de control			
	Ausencia		Presencia		Ausencia		Presencia	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Reacción inflamatoria	10	100%	0	0%	10	100%	0	0%
Infección	10	100%	0	0%	10	100%	0	0%
Fractura de la zona de trabajo	8	80%	2	20%	8	80%	2	20%
Tejido blando llenando el defecto	8	80%	0	0%	8	0%	8	80%
Tejido óseo llenando el defecto	0	0%	8	80%	0	0%	0	0%

Fuente: elaboración propia

Figura 4. Imagen radiográfica de los grupos control y experimental después de 6 semanas de cicatrización; a la izquierda el grupo control y a la derecha el grupo experimental donde se muestra el aumento de la radioopacidad.



Fuente: fotografía tomada por los autores

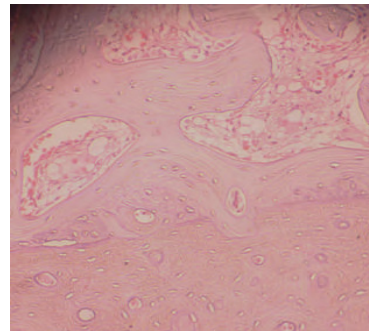
Cuadro 2. Efecto radiográfico, después de 6 semanas de cicatrización, observaciones según el patrón de trabeculado a nivel del área de estudio y área de control

Variación en el trabeculado	Grupo de estudio		Grupo de control	
	n	%	n	%
Grado I	0	0%	2	25%
Grado II	0	0%	6	75%
Grado III	3	37,5%	0	0%
Grado IV	5	62,5%	0	0%
Grado V	0	0%	0	0%
Total	8	100%	8	100%

Fuente: elaboración propia

Respecto a los resultados histológicos se observó que el 87.5% de las muestras del grupo de estudio mostró presencia de hueso maduro compacto mientras que en el grupo control se reportó un 100% de ausencia del mismo (Figura 5). En el grupo control se observó como máximo grado de madurez ósea la presencia de islotes aislados de hueso inmaduro en un 87.5% de las muestras. Se observó con respecto a la "continuidad del defecto con el hueso normal" que en el grupo de estudio el 75% de las muestras alcanzó una continuidad completa del "defecto con el hueso normal" en comparación al grupo control en el que el 75% de las muestras alcanzó tan solo una "formación ósea moderada" (Cuadro 3).

Figura 5. Corte histológico del área experimental donde se muestran islotes de tejido óseo maduro compacto.



Fuente: fotografía tomada por los autores

Cuadro 3. Efecto histológico, observaciones microscópicas después de 6 semanas de cicatrización, según el grado de madurez ósea

Grado de madurez ósea	Presencia				Ausencia			
	Grupo de estudio		Grupo de control		Grupo de estudio		Grupo de control	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Reacción inflamatoria	0	0%	0	0%	10	100%	0	0%
Infección	1	12,5%	0	0%	10	100%	0	0%
Fractura de la zona de trabajo	5	62,5%	2	20%	8	80%	2	20%
Tejido blando llenando el defecto	4	50%	0	0%	8	0%	8	80%
Tejido óseo llenando el defecto	7	87,5%	8	80%	0	0%	0	0%

Fuente: elaboración propia

Discusión

La ROG se basa en la formación de nuevo hueso para el relleno de defectos óseos; comprende el uso de membranas con funciones de barrera para evitar la infiltración de componentes celulares (células epiteliales y conjuntivas) en la zona de reparación (9,10).

En esta investigación fue utilizada la membrana amniótica liofilizada como barrera biológica para el proceso de regeneración ósea, que fue realizado en los defectos óseos creados en el tejido óseo de la región más inferior de las extremidades posteriores de los conejos (tibias). Se determinó que el efecto de esta nueva membrana, realizando la valoración de la misma en el proceso de regeneración ósea guiada en tres niveles: a nivel clínico (realizando la valoración macroscópica de la zona donde se colocó la membrana después de 6 semanas de cicatrización), a nivel radiográfico (mediante la variación encontrada en la imagen radiográfica en relación al patrón de trabeculado después de 6 semanas de cicatrización) y a nivel histológico (mediante las observaciones

microscópicas de las muestras obtenidas del proceso de regeneración ósea después de 6 semanas de cicatrización, para lo cual se tomaron en cuenta 2 criterios: la continuidad del defecto óseo – hueso normal y el grado de madurez ósea). Con este fin se obtuvieron en total 20 muestras (10 del grupo de estudio y 10 del grupo control) las cuales fueron analizadas clínica, histológica y radiográficamente.

Para el análisis clínico se tomaron en cuenta los siguientes criterios: la reacción inflamatoria y proceso infeccioso, presentando un 100% de ausencia tanto en el grupo de experimental como en el grupo control. Otro criterio tomado en cuenta para este análisis clínico fue la formación de fracturas, la cual se hizo presente en el 20% de casos en ambos grupos. Finalmente la presencia de tejido duro que llenó la zona del defecto óseo se presentó en un 80% de casos del grupo de estudio, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$), mientras que la presencia de tejido blando que llenó la zona del defecto óseo se presentó en el 80% de casos del grupo control, siendo igualmente estadísticamente significativo la diferencia ($P < 0.05$), según el test exacto de Fisher.

Para el análisis radiográfico según el método utilizado por Taguchi y col (8), el cual clasifica la calidad del tejido óseo según el patrón de trabeculado en GRADO I, II, III, IV y V (GRADO I imagen completamente radiolúcida, GRADO V imagen completamente radiopaca y GRADO III imagen con patrón de trabeculado mandibular normal), el grupo de estudio presentó patrones GRADO III y IV (tomando en cuenta que la tibia de conejo presenta imágenes más radiopacas que la mandíbula debido a la gruesa cortical que posee), mientras que en el grupo control presentaron patrones GRADO I y II, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de estudio y control, según el test exacto de Fisher.

Para el análisis histológico se tomaron en cuenta dos patrones según el método de Helple: el primer patrón fue el grado de madurez ósea, según este criterio en el grupo control, las observaciones microscópicas presentaron básicamente proliferación y diferenciación de células indiferenciadas e islotes aislados de hueso inmaduro (87.5%), mientras que en el grupo de estudio se encontró principalmente hueso maduro compacto (87.5%) y en la parte más superficial de las muestras se observó islotes aislados de hueso inmaduro (62.5%) y espículas óseas uniendo islotes de hueso inmaduro (50%), siendo ambas estadísticamente significativas ($p < 0.05$); el segundo patrón tomado en cuenta para este análisis fue la continuidad del defecto óseo – hueso normal, en el cual según las observaciones microscópicas el grupo de estudio presentó principalmente una continuidad total del defecto – es decir el relleno del 100% del defecto, mientras que en el grupo control se observó básicamente una formación moderada de hueso, es decir un relleno de un tercio del defecto (75%), siendo los resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

En la actualidad, no existen o todavía no han sido dados a conocer a la comunidad científica, trabajos anteriores que hayan aplicado los injertos de membrana amniótica como barrera en el proceso de regeneración ósea. La mayoría de trabajos en los cuales se utiliza esta membrana amniótica liofilizada se pueden encontrar en el mundo de la oftalmología (6,11,12), ya sea que estén siendo utilizados en intervenciones quirúrgicas de reconstrucciones de la superficie ocular o en casos de intervenciones quirúrgicas de pterigon ocular en los cuales se utiliza esta membrana como una barrera para evitar el paso de microorganismos y la vez facilitar la reepitelización de la zona de trabajo.

En todos los casos intervenidos el uso de la membrana amniótica liofilizada se mostró como una técnica segura, ya que en ningún caso se encontraron complicaciones intra o post-operatorias, ni

se observó un empeoramiento de la zona del trabajo. Asimismo los resultados obtenidos por los estudios se mostraron estables por un periodo amplio de seguimiento. Esto se puede explicar gracias a que esta membrana amniótica proporciona una membrana basal la cual favorece la migración y diferenciación celular (6,11,13) (en nuestro estudio podemos decir que favoreció la migración de células multipotenciales que posteriormente se diferenciaron en osteoblastos); reduce la inflamación de la zona por debajo de la membrana (6,14); y actúa como sello biológico evitando el pase de diversas clases de microorganismos hacia la herida (en nuestro estudio evitó que diversos tipos de tejidos, especialmente el epitelial y el conjuntivo, ingresen dentro del defecto óseo impidiendo de esta manera una regeneración completa).

Es así que con estos resultados estamos demostrando que la membrana amniótica liofilizada ha tenido un efecto positivo en el proceso de regeneración ósea guiada, con lo cual estaríamos ante un gran avance en el campo de los biomateriales puesto que este material es mucho más accesible, en términos económicos, que los materiales que actualmente se encuentran en el mercado. Por otro lado estamos utilizando un material que es producido en las instalaciones del banco de tejidos del Instituto Nacional de Salud del Niño, con lo cual estamos revalorizando la biotecnología peruana.

Referencias bibliográficas

1. **La Rosa M, Cepeda J.** Regeneración ósea guiada de cara al año 2000, consideraciones clínicas y biológicas. *Rev ADM* 2000; 57(4): 147-53.
2. **Carranza F, Newman M.** Periodontología Clínica de Glickman. 8ª edición. México: Interamericana McGraw-Hill; 1998.
3. **Novaes B.** Cirugía Periodontal con finalidad protésica. Brasil: Amolca; 2001.
4. **Novaes AB, Novaes Jr AB, Moraes N, et al.** Compliance with supportive periodontal therapy. *J Periodontology* 1996; 67: 213-16.
5. **Peral BG, Redondo LM, Verrier HA, et al.** Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Rev Esp Cirug Oral y Max* 2008; 30(1): 15-24.
6. **Aguirre PE, Ogradnik MT, Zarate MV, et al.** Use of amniotic membrane in ophthalmology surgery, first cases. *Nucleotecnica* 2008; 27(40): 1-8.
7. **Eill SR, Cobb CM, Rapley JW, et al.** In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J Clin Periodontol* 1999; 26 (4): 239-45.
8. **Taguchi A, Tanimoto K, Sueti Y, et al.** Observer agreement in the assessment of mandibular trabecular bone pattern from panoramic radiographs. *Dentomaxillofacial Radiology* 1997; 26(2): 90-4.
9. **Paolantonio M.** Combined periodontal regenerative technique in human intrabony defects by collagen membranes and anorganic bovine bone. *J Periodontol* 2001; 73(2): 158-66.

10. **Ramos PD.** Regeneración ósea guiada con injerto autógeno de mentón. *Odontol Sanmarquina* 2007; 10(2): 33-6.
11. **Rodríguez MJ, De Bonis RE, Rodríguez SA, et al.** Trasplante de membrana amniótica en patología de la superficie ocular. *Hospital Clínico de San Carlos de Madrid, Revision de Casos*, 2004.
12. **Stangogiannis D, Martínez M, Paz LE, et al.** Trasplante de membrana amniótica o Auto injerto conjuntival en Pterigión Nasal Recidivantes. *Rev Oftalmol Venez* 2004; 60 (4): 15-24.
13. **Mohammad HS, Shahriar A, Ahad K, et al.** Human amniotic membrane, best healing accelerator, and the choice of bone induction for vestibuloplasty technique (an animal study). *Transplant Research and Risk Management* 2011; (3): 1-8.
14. **Sikder MA, Alam K, Ferdousi F, et al.** Reconstruction of oral mucosal defect with Oven Dried Human Amniotic Membrane graft: A case report. *Bangladesh Journal of Medical Science* 2010; 9(3):170-3.