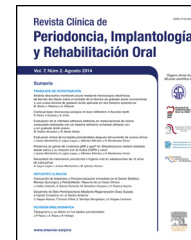




Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral

www.elsevier.es/piro



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Influencia de la presión de oxígeno ambiental sobre la regeneración ósea guiada

Víctor Chumpitaz-Cerrate^a, César Franco-Quino^a, Elías Aguirre-Siancas^a,
Adrián Mallma-Medina^a, Cecilia Rodríguez-Vargas^a e Yuri Castro-Rodríguez^{b,*}

^a Cátedra de Fisiología y Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

^b Cirujano Dentista, Práctica privada, Lima, Perú

Recibido el 25 de marzo de 2016; aceptado el 31 de agosto de 2016

PALABRAS CLAVE

Oxígeno;
Regeneración ósea;
Hipoxia celular;
Factor 1 inducible por
hipoxia

Resumen

Objetivo: Evaluar la influencia de la variación en la presión de oxígeno ambiental sobre la regeneración ósea guiada en cobayos.

Material y método: Treinta y dos cobayos machos de 750 ± 50 g de peso fueron asignados en 2 grupos de 16 integrantes cada uno (grupo A: trabajado a 150 msnm en la ciudad de Lima y a presión de oxígeno de 157 mm Hg; grupo B: trabajado a 3.230 msnm en la ciudad de Jauja y a presión de oxígeno de 107 mm Hg). En ambos grupos se indujeron defectos óseos mandibulares de 5×6 mm a través de un acceso quirúrgico extraoral; a 8 cobayos de cada grupo se les recubrió el defecto con una membrana de colágeno reabsorbible de origen porcino, mas al resto de animales no. Se evaluó el conteo celular de osteoblastos y osteocitos a los 15 y 30 días postoperatoriamente.

Resultados: A los 15 y a los 30 días, en los grupos trabajados en altura y en los que se aplicó la membrana, la cantidad de osteoblastos fue $71 \pm 12,1$ cél/camp y $83 \pm 7,2$ cél/camp respectivamente, y la de osteocitos fue $34,5 \pm 6,6$ cél/camp y $25 \pm 7,6$ respectivamente; siendo estos grupos, en todas las comparaciones, los que tuvieron mayor cantidad de células óseas, aunque sin ser diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Conclusión: Se encontró tendencia a formar mayor cantidad de células óseas en las muestras tratadas con regeneración ósea y expuestas a la altitud comparados con el nivel del mar.

© 2016 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: yuricastro_16@hotmail.com (Y. Castro-Rodríguez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2016.08.001>

0718-5391/© 2016 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: Chumpitaz-Cerrate V, et al. Influencia de la presión de oxígeno ambiental sobre la regeneración ósea guiada. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2016.08.001>

KEYWORDS

Oxygen;
Bone regeneration;
Cell hypoxia;
Hypoxia inducible
factor-1

Influence of ambient oxygen pressure on guided bone regeneration

Abstract

Objective: To evaluate the influence of the variation in ambient oxygen pressure on guided bone regeneration in guinea pigs.

Material and method: A total of 32 male guinea pigs weighing 750 ± 50 g were assigned into two groups of 16 (group A: studied at 150 metres above sea level in the city of Lima and oxygen pressure of 157 mm Hg; group B: was at 3230 meters above sea level in the city of Jauja and an oxygen pressure of 107 mm Hg). Bone defects of 5×6 mm were induced in the jaw in both groups through extra-oral surgical access. The defect in 8 guinea pigs of each group were covered with a porcine resorbable collagen membrane, but not in the other animals. The osteoblast and osteocyte cell counts were evaluated at 15 and 30 days post-operatively.

Results: At 15 and 30 days, in the groups studied at height and with the membrane applied, the osteoblast count was 71 ± 12.1 cells/field, and 83 ± 7.2 cells/field, respectively, and an osteocyte count of 34.5 ± 6.6 cells/field, and 25 ± 7.6 cells/field, respectively. These groups had a higher number of bone cells in all the comparisons, but there were no statistically significant differences ($P > .05$).

Conclusion: There was a tendency to form a greater amount of bone cells was found in the samples treated with bone regeneration and exposed to altitude compared to those at sea level.

© 2016 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El tejido óseo está constituido por un conjunto de células y por una matriz extracelular calcificada. En condiciones basales dichos componentes se encuentran en constante mecanismo de remodelación: formación y resorción¹. Durante una intervención quirúrgica sobre el tejido óseo, como por ejemplo en una osteotomía, predominan los mecanismos de formación debido a la necesidad de una recuperación eficaz, desempeñando las células osteoprogenitoras y los osteoblastos un rol fundamental durante el proceso de cicatrización y de reparación ósea². El maxilar y la mandíbula y los rebordes alveolares relacionados con ellos son blancos de diversas alteraciones que pueden ser ocasionadas por traumatismos, por progresión de una enfermedad periodontal o por avance de tumores benignos y/o malignos; debido a ello la reparación y reconstrucción de los defectos óseos ha sido tema de investigación desde los años 70, durante los cuales surgen las técnicas de regeneración tisular guiada y de regeneración ósea guiada (ROG)³. Estas técnicas involucran el empleo de una membrana de barrera para promover la repoblación selectiva del defecto óseo por células que migran del tejido conectivo del ligamento periodontal y del hueso relacionado, en lugar de células del tejido gingival y/o epitelial⁴⁻⁶. Estas células migrantes presentan una capacidad oclusiva que evita la entrada del tejido conectivo fibroso, protegen la herida contra una posible invasión bacteriana y proveen un espacio suficiente en el que el tejido inicie adecuadamente su neoformación⁷.

Diversos factores locales y sistémicos influyen en la repoblación celular dentro del defecto óseo; uno de estos

factores es la disposición de oxígeno tisular en el tejido lesionado⁸. La hipoxia local es un factor crítico en diversas condiciones médicas que afectan al hueso y al cartílago; así, en condiciones experimentales, las células estromales de médula ósea humana se adaptan eficientemente a los ambientes con baja cantidad de oxígeno por un mecanismo de adaptación de su expresión génica y metabólica hacia las condiciones hipóxicas, lo que resulta en un incremento de la proliferación y diferenciación⁹, donde están involucradas diversas moléculas como el factor inducible por hipoxia (HIF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), entre otros^{8,10-12}.

Debido a que la relación entre la hipoxia tisular y el metabolismo óseo aún está en proceso de entendimiento, y existiendo resultados dispares al relacionar estas variables¹²⁻¹⁵, la presente investigación evaluó el efecto de la presión de oxígeno ambiental sobre la regeneración ósea guiada en cobayos expuestos a 157 mm Hg (150 msnm, al nivel del mar) y a 107 mm Hg (3.320 msnm, al nivel de Los Andes) evaluados a los 15 días y a los 30 días.

Material y métodos

Diseño y población del estudio

Estudio preclínico experimental donde se emplearon 32 cobayos machos de 750 ± 50 g de peso, nativos del nivel del mar, que fueron ambientados por 7 días en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los cobayos estuvieron a una temperatura ambiente entre 19° a 22° C, con una humedad de 40% a 50%,

en períodos de luz/oscuridad de 12 h alternadas iniciando a las 8 a.m., con agua y alimentación balanceada *ad libitum*, acorde a las recomendaciones de la guía ética para animales de experimentación: *Guide for the care and use of laboratory animals*¹⁶. El tamaño de la muestra se determinó tomando como referencia estudios donde se trabaja con variables y material biológico similar al empleado en esta investigación^{12,17}.

Maniobra

Luego de la semana de ambientación, los cobayos fueron asignados en 2 grupos de 16 integrantes cada uno: el grupo A fue trabajado en la ciudad de Lima (150 msnm), a una presión de oxígeno ambiental de 157 mm Hg; este grupo fue el control al considerar la presión de oxígeno al nivel del mar como el parámetro basal, y fue mantenido en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El grupo B fue trasladado a la ciudad de Jauja (3.320 msnm), a una presión de oxígeno ambiental de 107 mm Hg, y fueron alojados en el Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura-Mantaro de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (IVITA-Mantaro).

Intervención

Todos los cobayos fueron sometidos a anestesia general con pentobarbital (Halatal®) administrado a dosis de 1 ml/2,5 kg por vía intraperitoneal. Luego se realizó una incisión extraoral de 15 mm desde el ángulo mandibular derecho hacia adelante. Luego del decolado a espesor total con legras P24g se procedió a realizar la osteotomía con una fresa quirúrgica de carburo de 1 mm de diámetro. La osteotomía fue extendida hasta crear defectos de forma rectangular de 5 × 6 mm. En 8 cobayos de cada grupo se colocó la membrana de colágeno reabsorbible (matriz de colágeno de origen porcino) y luego se procedió a la reposición de los tejidos y suturar (puntos simples desde el plano profundo hasta el plano superficial con ácido poliglicólico 5-0 agujas cortantes). En los 08 cobayos restantes de cada grupo no se colocó membrana y luego se procedió a la reposición de los tejidos y sutura.

Registro y análisis de las variables

A los 15 días de realizado el procedimiento quirúrgico se seleccionaron de cada grupo 4 cobayos con membrana y 4 cobayos sin membrana, que inmediatamente fueron sacrificados. A los 30 días de realizada la cirugía se sacrificó a los restantes cobayos de cada grupo. Todos los cobayos fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital (1 ml/250 g por vía intraperitoneal), luego se procedió a su decapitación y las cabezas fueron desecadas para el posterior análisis histológico de las zonas intervenidas. El análisis histológico estuvo focalizado en el número de osteoblastos y osteocitos, para lo cual se prepararon láminas histológicas coloreadas con hematoxilina-eosina. Para la medición celular se procedió a identificar, específicamente, la zona intervenida mediante microscopía; luego se observó 3 campos de dicha zona tomados al azar; esto se realizó en cada una de las

láminas obtenidas de cada cuy. De las 3 observaciones se obtuvo la media, la cual fue el número de osteocitos para dicho cuy¹².

Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 23. Los resultados se expresan utilizando la media y desviación estándar. La normalidad fue determinada por las pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Dada la normalidad de los datos y la homocedasticidad se utilizó la prueba «t» de Student para muestras independientes en las comparaciones realizadas. El nivel de significación considerado fue de 0,05.

Resultados

A nivel del mar el conteo de osteoblastos a los 15 días de posoperatorio para el grupo con membrana fue de $62 \pm 12,4$ cél/camp, mientras que para el grupo sin membrana fue de $27 \pm 5,6$ cél/camp. En la altura, a los 15 días de control, el conteo de osteoblastos fue de $71 \pm 12,1$ para el grupo con membrana y de $36,5 \pm 5,7$ para el grupo sin membrana. La cantidad de osteocitos para el grupo con membrana fue de $29,5 \pm 6,9$ y de $14,5 \pm 4,2$ para el grupo sin membrana (tabla 1, fig. 1).

En la segunda evaluación realizada a los 30 días posteriores al procedimiento quirúrgico, la diferencia celular fue menos notoria, pero igualmente favoreció a los animales intervenidos en la altura a 3.320 msnm (107 mm Hg) (tabla 2, fig. 2). Sin embargo, en todas las comparaciones realizadas no se encontraron diferencias estadísticas.

Discusión

En la presente investigación, en el control realizado a los 15 días, encontramos una mayor cantidad de osteoblastos y osteocitos en el grupo trabajado en altura (con y sin membrana) en comparación con el grupo trabajado a nivel del mar (con y sin membrana). Estos resultados son similares a lo reportado por Aguirre¹², quien concluyó que la presión de oxígeno ambiental influyó en la formación ósea a los 15 días posteriores a la cirugía, mejorando la proliferación de osteocitos en el grupo trabajado en altura en comparación con el grupo trabajado al nivel del mar; sin embargo, en la referencia reportada compararon la formación posterior, pero sin colocación de membrana de colágeno, y si existieron diferencias estadísticas, pero en el presente trabajo dicha significación no fue encontrada.

En el control realizado a los 30 días encontramos una mayor cantidad de osteoblastos en el grupo trabajado en altura con membrana en comparación con el grupo trabajado a nivel del mar con membrana, pero al comparar la cantidad de osteocitos entre ambos grupos se encontró prácticamente el mismo número de células. Igualmente la diferencia entre la cantidad de osteoblastos y de osteocitos, entre los grupos trabajados en altura sin membrana y a nivel del mar sin membrana, favorecieron ligeramente al grupo expuesto a 107 mm Hg (3320 msnm). Estos resultados son similares a lo reportado por Aguirre¹², quien también reportó que dichas diferencias no fueron estadísticamente

Tabla 1 Conteo celular a los 15 días

	Osteoblastos			Osteocitos		
	Promedio	DS	P	Promedio	DS	p
Nivel del mar (con membrana)	62	12,4	0,339	29,5	6,9	0,334
Altura (con membrana)	71	12,1		34,5	6,6	
Nivel del mar (sin membrana)	27	5,6	0,56	14,5	4,2	0,89
Altura (sin membrana)	36,5	5,7		20	3,4	

p>0.05, t de student para grupos independientes.

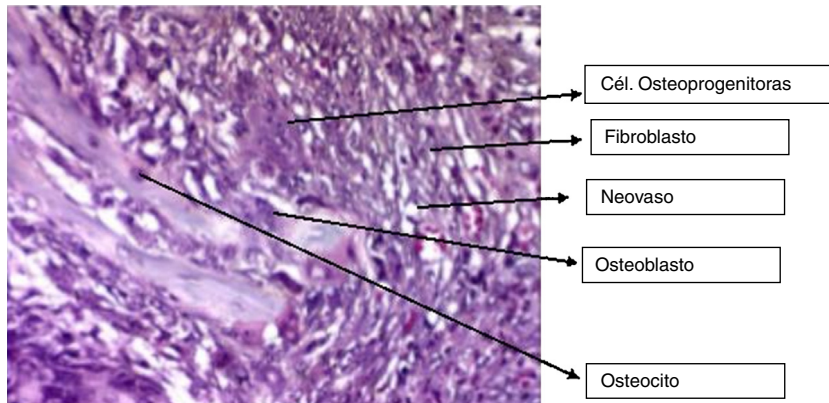


Figura 1 Microfotografía de zona representativa del grupo al nivel del mar con membrana a los 15 días. Microfotografía con aumento de 400 ×, coloración H-E. Se observa tejido conectivo de granulación con fibroblastos, células osteoprogenitoras y neovasos; formación de trabéculas óseas, osteoblastos y osteocitos.

Tabla 2 Conteo celular a los 30 días

	Osteoblastos			Osteocitos		
	Promedio	DS	P	Promedio	DS	p
Nivel del mar (con membrana)	77	9,8	0,362	23,5	5,3	0,758
Altura (con membrana)	83	7,2		25	7,6	
Nivel del mar (sin membrana)	48	8,4	0,443	21	5,2	0,858
Altura (sin membrana)	53	8,8		22	9,4	

p>0.05, t de student para grupos independientes.

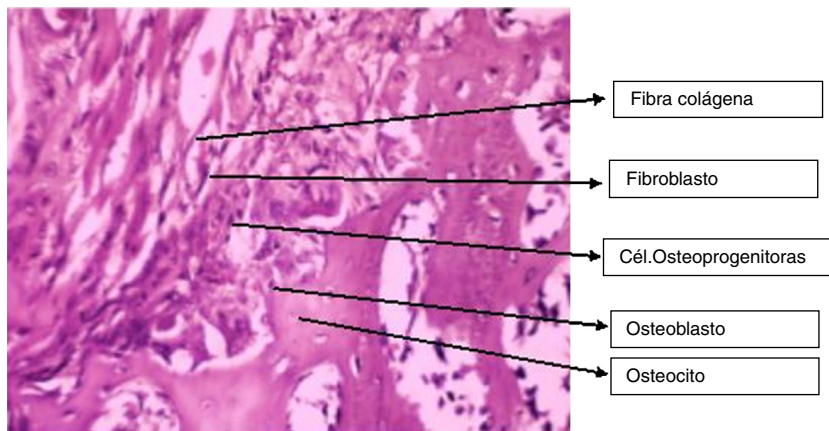


Figura 2 Microfotografía de zona representativa del grupo en altura con membrana a los 15 días. Microfotografía con aumento de 400 ×, coloración H-E. Se observa tejido conectivo de granulación con fibroblastos, fibras colágenas, células osteoprogenitoras, osteoblastos y osteocitos.

significativas, coincidiendo con los resultados estadísticos del presente estudio.

A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones realizadas, la cantidad de las células evaluadas, en el proceso de regeneración ósea guiada, favoreció siempre a los cobayos expuestos a 107 mm Hg (3320 msnm), tanto a los 15 días como a los 30 días. Se considera que el motivo principal de esta tendencia es que la menor hipoxia tisular en la zona lesionada, en el grupo expuesto a 107 mm Hg de oxígeno ambiental, lograría estabilizar diversas moléculas que favorecen el metabolismo óseo; donde destaca nitidamente el HIF, cuya subunidad citosólica (HIF- α) logra mayor expresión en tejidos donde la concentración de oxígeno desciende por debajo de 5%^{10,18,19}. Así se ha encontrado que la sobreexpresión genética de HIF-1 alfa en osteoblastos maduros de roedores ha reportado mejoras en la formación ósea y la angiogénesis en un modelo de distracción osteogénica; mientras los osteoblastos que carecen de HIF-1 alfa fueron incapaces de unir la brecha de la distracción¹³. Además, la carencia de HIF-1 alfa y/o HIF-2 alfa en osteoblastos demuestra una significativa disminución en el volumen óseo, así como en la formación de vasos sanguíneos. Estos datos revelan el rol central de la señalización HIF en osteoblastos para el mantenimiento de la homeostasis ósea y para promover la vascularización esquelética^{20,21}, destacando también dentro de este rol regulador del metabolismo positivo del tejido óseo a la anexina A2 (ANXA2) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)^{18,22}, siendo, probablemente, el factor el VEGF la molécula más importante de la vía corriente abajo del HIF, debido a su decisiva implicación en el proceso de osteogénesis, de forma directa al activar a las células osteoblásticas o de forma indirecta mediante su potente acción angiogénica, pero a medida que van transcurriendo los días dicho proceso tiende a normalizar el suministro de oxígeno en ambos grupos de animales, y las diferencias en el conteo celular encontradas a los 15 días van disminuyendo a los 30 días^{12,23,24}.

Conclusiones y perspectivas futuras

Por los resultados de los estadígrafos empleados en el presente estudio, no se puede afirmar que las diferencias encontradas se deban a la variación en la presión de oxígeno ambiental; sin embargo, al hallarse una tendencia hacia una mejor regeneración ósea guiada en el grupo trabajo en la altitud sería recomendable realizar más investigaciones sobre la variables propuestas, mediante otros diseños, con otros modelos animales o con diferentes tiempos de evaluación, para definir si dichas tendencias llegan a ser significativas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

La investigación fue financiada por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Conflicto de intereses

Los autores no mostraron ningún tipo de conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Gartner L, Hiatt J. Histología básica. Barcelona: Elsevier; 2011. p. 84–9.
2. Gomez de Ferraris M, Campos Muñoz A. Embriología, histología e ingeniería tisular bucodental. México DF: Editorial Médica Panamericana; 2009. p. 381–7.
3. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976;47:2256–60.
4. Melcher AH, McCulloch CAG, Cheong T, Nemeth E, Sigha A. Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. *J Periodont Res.* 1987;22:246–7.
5. Lang N. Focus on intrabony defects—conservative therapy. *Periodontol 2000.* 2000;22:51–8.
6. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: Combinations of barrier membranes and grafting materials—biological foundation and preclinical evidence. A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008;35 Suppl 8:106–16.
7. Silvestri M, Rasperini G, Milani S. 120 infrabony defects treated with regenerative therapy: Long term results. *J Periodontol.* 2011;82:668–75.
8. Aguirre E. Influencia de la hipoxia sobre el metabolismo óseo. Rol central del factor inducible por hipoxia. *Ann Fac Med.* 2013;74:321–5.
9. Fábán Z, Ramadurai S, Shaw G, Nasheuer H, Kolch W, Taylor C, et al. Basic fibroblast growth factor modifies the hypoxic response of human bone marrow stromal cells by ERK-mediated enhancement of HIF-1 α activity. *Stem Cell Res.* 2014;12:646–58.
10. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology.* 2009;24:97–106.
11. Tang W, Yang F, Li Y, de Crombrughe B, Jiao H, Xiao G, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by osteoblast-specific transcription factor osterix (Ox) in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2012;287:1671–8.
12. Aguirre-Siancas EE. Influencia de la variación de la presión de oxígeno ambiental en la formación ósea en cuyes nativos del nivel del mar. *Ann Fac Med.* 2014;75:125–9.
13. Razban V, Sahebqadam A, Khoshdel A. HIF-1 α overexpression induce angiogenesis in mesenchymal stem cells. *Biores Open Access.* 2012;1:174–83.
14. Villarruel S, Boehm C, Pennington M, Bryan J, Powel K, Muschlen G. The effect of oxygen tension on the in vitro assay of human

- osteoblastic connective tissue progenitor cells. *J Orthop Res.* 2008;26:1390–7.
15. Wang Y, Li J, Wang Y, Lei L, Jiang CH, An S, et al. Effects of hypoxia on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem.* 2012;362:25–33.
 16. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington D.C.: National Academy Press; 2010.
 17. Baldo H, Lima A, Monti L, Pires A. Estudio histológico comparativo de la reparación ósea entre hueso alveolar en los cerdos sometidos a osteotomía con alta y baja velocidad, con refrigeración líquida. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac.* 2012;34:18–24.
 18. Stegen S, van Gestel N, Carmelie G. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone.* 2015;70:19–27.
 19. Chia-Hsin L, Yu-Han C, Shih-Yeh L, Kuei-Chang L, Yu-Chen H. Recent progresses in gene delivery-based bone tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2013;31:1695–706.
 20. Komatsu DE, Hadjiargyrou M. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes: VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone.* 2004;34:680–8.
 21. Zhao Q, Shen X, Zhang W, Zhu G, Qi J, Deng L. Mice with increased angiogenesis and osteogenesis due to conditional activation of HIF pathway in osteoblasts are protected from ovariectomy induced bone loss. *Bone.* 2012;50:763–70.
 22. Genetos DC, Wong A, Watari S, Yelowley CE. Hypoxia increases Annexin A2 expression in osteoblastic cells via VEGF and ERK. *Bone.* 2010;47:1013–9.
 23. Götz W, Reichert C, Canullo L, Jäger A, Heinemann F. Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing—A brief overview. *Ann Anatomy.* 2012;194:171–3.
 24. Wang C, Huang K, Sun Y, Yang Y, Ko J, Weng L, et al. VEGF modulates angiogenesis and osteogenesis in shockwave-promoted fracture healing in rabbits. *J Surg Res.* 2011;171:114–9.