



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE MEDICINA**

**Naringina y sus Efectos a Nivel Densitométrico sobre la Regeneración Guiada con Extracto de Uva y Colágeno de Origen Porcino. Estudio en Modelo Experimental con Conejos Albinos de Nueva Zelanda**

**D. Sergio López Lozano**

**2017**





## **Instituto Universitario de Investigación del Envejecimiento**

Universidad de Murcia

PROGRAMA DE DOCTORADO

BIOLOGÍA Y PATOLOGÍA DEL ENVEJECIMIENTO 2015

**Naringina y sus efectos a nivel densitométrico sobre la regeneración guiada con extracto de uva y colágeno de origen porcino. Estudio en modelo experimental con conejos albinos de Nueva Zelanda**

**Tesis Doctoral**

Autor: Sergio López Lozano

Directores: Francisco José Gómez García

Nuria García Carrillo



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de la tesis doctoral, los Dres. Francisco José Gómez García y Nuria García Carrillo, quienes, sin su apoyo, orientación y ayuda, no hubiera sido posible la realización de esta tesis doctoral.

Quiero hacer extensiva esta gratitud al personal del Animalario de la Universidad de Murcia, especialmente a Víctor Bolarín y a mi compañero Manuel González, por su ayuda en el quirófano de los animales.

Finalmente, agradecer el apoyo de mi familia, pilar imprescindible de mi vida, a mis padres y hermanas.



## **ÍNDICE**

<b>I.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades y breve reseña histórica de los biomateriales.....	2
1.2 Tejido óseo	
1.2.1 Composición del tejido óseo. Hueso esponjoso, hueso cortical.....	3
1.2.2 Células óseas, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos.....	4
Osteoblastos	
Osteocitos	
Osteoclastos	
1.2.3 Osteoclastogénesis, sistema OPG/RANKL/RANK.....	8
1.2.4 Proteínas óseas, colágenas y no colágenas. Hormonas del tejido óseo.....	9
Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (PMO)	
Hormonas más importantes que influyen en la resorción ósea.	
1.3 Funciones y características del hueso.....	12
1.4 Densidad ósea, importancia en la Implantología y formas de medirla.....	13
Clasificación de Norton y Gamble basada en el análisis óseo por medio de TC y las unidades Hounsfield	
1.5 Flavonoides.....	17
1.5.1 Consideraciones generales sobre los flavonoides.....	17
1.5.2 Estructura química, biosíntesis, clasificación.....	18
1.5.3 Fuentes y métodos de obtención de flavonoides cítricos.....	22
1.5.4 Efectos biológicos.....	25
Propiedad antioxidante	
Efectos antiateroscleróticos y antitrombóticos	
Efectos hepatoprotectores y sobre el sistema gástrico	
Efectos antibacterianos	
Efectos antiosteoporóticos	
Efectos anti-inflamatorios	
Efectos sobre asma y aparato respiratorio	
Efectos antitumorales	
Efectos antivirales	
Efectos sobre el sistema nervioso	
1.5.5. Flavonoides cítricos (Naringina, naringenina, hesperidina) y sus efectos en el organismo.....	31
Acciones de los flavonoides cítricos	
Acciones generales de la naringina	
Acciones generales de la naringenina	
Acciones generales de la hesperidina	
1.5.6 Acciones específicas sobre el hueso de la naringina y naringenina.....	37

Naringina y hueso  
Naringenina y hueso

<b>II.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 Hipótesis de trabajo.....	43
2.2 Objetivos.....	43
<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 Materiales	
3.1.1 Animales.....	47
3.1.2 Agentes.....	47
3.1.3 Aparatos.....	48
3.2 Métodos, procedimiento experimental estudio “in vivo”	
3.2.1 Planificación del procedimiento.....	49
3.2.2 Protocolo quirúrgico .....	50
3.2.2.A. Examen, registro y documentación de datos.....	50
3.2.2.B Cuidados y datos de interés prequirúrgicos.....	51
3.2.2.C Premedicación y anestesia.....	52
Método anestésico	
Profilaxis antibiótica	
Premedicación	
Inducción anestésica	
Afeitado y antisepsia	
Procedimiento quirúrgico	
Cuidados postoperatorios	
Eutanasia. Obtención de las muestras	
3.2.3. Protocolo de adquisición mediante microtomografía computerizada y análisis de las muestras.....	57
Análisis estadístico descriptivo	
<b>IV.- RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>V.-DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
<b>VI.-CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>143</b>



# **I. INTRODUCCIÓN**

La Implantología ha experimentado un desarrollo paulatino para satisfacer la demanda de la población a la hora de reponer la estética y función reducidas o anuladas tras la pérdida de piezas dentarias. Se prevé un aumento de la población de personas de más edad en España, así como un crecimiento del subgrupo de mayores de 80 años denominado "sobreenvejecimiento" (Abades y Rayon, 2012), hecho que va acompañado de una creciente demanda de soluciones odontológicas, entre ellas, la de reponer piezas perdidas.

Actualmente, el grado de satisfacción de los pacientes con implantes dentales es muy elevado, sin diferencias significativas entre portadores de prótesis fija sobre implantes y portadores de sobre-dentaduras implantosoportadas, tanto en maxilar superior como en mandíbula (Mestre et al., 2001).

La investigación actual en Implantología sigue varios caminos, de los cuales destacan dos sobre el resto. Por un lado la búsqueda de nuevas superficies para el implante en cuanto a composición química y diseño geométrico se refiere y, por otro lado, la búsqueda de biomateriales que suplan la ausencia de hueso en las zonas que así lo requieran. Es en este campo donde tiene aplicación nuestro objeto de estudio.

## **1.1 Generalidades y breve reseña histórica de los biomateriales**

El hombre, desde sus inicios, ha querido reponer las piezas dentarias ausentes o conservar dientes naturales, no sólo en los vivos, sino también en los muertos (para embellecer el recuerdo de la persona fallecida) mediante elementos que sustituyan a los dientes para restaurar la función y estética perdida.

Las constancias arqueológicas de una primera prótesis implantológica nos sitúan en la Prehistoria. En la Edad Antigua se realizaron implantes de piedras y metales preciosos, así como trasplantes de dientes humanos y animales. En la Edad Media se reimplantaban dientes en su alvéolo y se fijaban con hilos de oro. Es en la Edad Moderna cuando se colocan los primeros implantes metálicos intralveolares. En la actualidad se describe el fenómeno de la osteointegración y se reponen los dientes perdidos con implantes dentales (Lemus et al., 2009).

El primer indicio del empleo de injertos óseos data de 1668, cuando Van Meekren implanta en el humano, hueso heterólogo de un perro con el fin de reparar un defecto en el cráneo. Merrem en 1809, realiza con éxito el primer trasplante de injerto autólogo óseo. MacEwen, en 1879

informa el uso de injerto de hueso autólogo para tratar un defecto óseo y McKeever en 1960, notifica el uso de injerto de hueso autólogo, tomado de la cresta iliaca, para reparar defectos de la tibia (Vergara et al., 2012).

En el campo de biomateriales, el mejor sustituto óseo es, actualmente, por poseer la capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora, el hueso autólogo (del propio paciente). Sin embargo, su disponibilidad es limitada y este factor ha hecho que se busquen las mismas características del hueso autólogo proyectadas en otros materiales.

El empleo de injertos óseos como alternativa de reconstrucción de defectos óseos, ya sean congénitos u ocasionados como traumatismos, secuelas oncológicas e infecciosas, tienen como finalidad restablecer la integridad anatómica y funcional de una estructura alterada (Soto y Guadalupe, 2005). Las aplicaciones clínicas de los rellenos de cavidades en cirugía maxilofacial van desde fisuras alveolares, elevaciones de seno o de fosas nasales para la inserción de implantes osteointegrados, alvéolos post-extracción, defectos crestales tratados de forma preprotésica y periodontales hasta aquellas situaciones en las que resulte un defecto o cavidad postquirúrgico en el maxilar, como por ejemplo tras apicectomías, quistectomías, exéresis de tumores odontogénicos u óseos, e incluso en cirugía cráneo-facial para relleno del seno frontal (Infante et al., 2007).

## **1.2 Tejido óseo**

### **1.2.1 Composición del tejido óseo. Hueso esponjoso, hueso cortical**

La arquitectura ósea está diseñada de tal manera que, si se corta longitudinalmente por la mitad un hueso, puede verse que el tejido óseo se presenta en dos tipos diferentes: sólido o compacto, formando una capa periférica y continua, y esponjoso o trabecular, constituido por una serie de trabéculas que delimitan aréolas que se comunican, alojando la médula ósea (Lattarjet, 1997). Básicamente el hueso es una matriz orgánica mineralizada por depósitos de sales de calcio (Zanchetta y Talbot, 2001), estructurado en laminillas (Suárez, 2012). La matriz orgánica está compuesta por proteínas colágenas (principalmente colágeno tipo I), proteínas no colágenas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina, etc) y proteoglicanos. Los cristales son hidroxiapatita y fosfato de calcio amorfo. Histológicamente, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está formado por osteonas y estructurado en laminillas de matriz osteoide mineralizada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso (Suárez, 2012).

Los cambios en el tejido óseo son consecuencia de las interacciones entre determinadas células óseas, que regulan el reclutamiento, proliferación y diferenciación de osteoblastos y osteoclastos (Delgado y Riancho, 2013). Las células óseas detectan señales de fuerza física, transforman estos estímulos físicos en señales bioquímicas (Keinan et al., 2014), integrando estas señales en las respuestas celulares de osteoblastos y osteoclastos, induciendo cambios apropiados en la arquitectura de los huesos, mecanismo denominado mecanotransducción (Natu et al., 2014).

La médula ósea es un tejido complejo, sinusoidal y bien organizado que se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos, del esternón, de los huesos de la cadera y de las vértebras esponjosas, cuya función principal es la de promover la hematopoyesis. Está constituida por varios tipos de células y mantiene en su estado indiferenciado y funcional a las células troncales hemopoyéticas o hemopoietic stem cells (HSC), que son las primeras células del sistema hemopoyético, con una identidad bien definida (Catalina et al., 2004).

### **1.2.2 Células óseas, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos**

Las células óseas se encuentran dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (o mesenchymal stem cells). Estas células mesenquimales pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en función de las diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes (Fernández et al., 2006).

#### **Osteoblastos**

Los osteoblastos tienen un tamaño grande (20-30  $\mu\text{m}$ ) y forma poliédrica. Disponen de un citoplasma basófilo, con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Sus procesos citoplasmáticos llegan hasta la matriz, comunicando con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos a través de proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas, siendo la conexión entre estas células la Conexina 43 (Fernández et al., 2006). También están los osteoblastos planos (bone lining cells), que se encuentran sobre la superficie del hueso, su cometido es la de crear una barrera y controlar el flujo de iones entre éstos y el espacio extraóseo, además de participar en la actividad metabólica del hueso (Khoury, 2010).

Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares. Por acción de proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor transformador de crecimiento B (TGF- $\beta$ ) y otros factores da origen a una célula madre osteoblástica que, a su vez, influenciada, entre otros, por la parathormona (PTH), la 1,25 dihidroxivitamina D (1,25D), prostaglandina E2, el IGF-I y el IGF-II prolifera y se diferencia dando origen a los osteoblastos y preosteoblastos, estos últimos son similares en estructura a los osteoblastos pero sin capacidad de síntesis de matriz orgánica ni división que tienen éstos (Zanchetta y Talbot, 2001).

Esta diferenciación está conformada en tres períodos definidos. El primero es de proliferación, donde la principal función celular es la expansión mitótica, se producen importantes cantidades de colágeno tipo I. En la segunda etapa, se produce una disminución de la producción de colágeno I debida a la sobreexpresión de la enzima fosfatasa alcalina y de ciertas proteínas asociadas a la MEC ósea, como la osteopontina y osteocalcina. En la última etapa, se acusa una disminución de la producción de la fosfatasa alcalina y se produce el depósito de cristales de calcio entre las fibras de colágeno (Caplan, 1991; Jaiswal et al., 1997; Sikavitsas et al., 2001). La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, un 20%, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos (15 %) (Jilka et al., 1998; Weinstein et al., 1998).

Su baja tasa de proliferación y rápida muerte celular programada, tras depositar una cierta cantidad de MEC, que constituye la base de los huesos (Bruder et al., 1999) se deben a que estas células son altamente diferenciadas y senescentes (Alvarez, 2009).

Los osteoblastos producen osteocalcina, que es determinante para la mineralización del hueso, síntesis estimulada por 1,25-dihidroxivitamina D. Esta osteocalcina se somete a carboxilación, proceso que depende de la vitamina K1. La osteocalcina carboxilada, que tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita y otros iones minerales, es determinante para la distribución de calcio en los huesos (Gonçalves et al., 2013).

Cabe destacar su capacidad de secretar importantes factores para el remodelado y la reparación de lesiones óseas, como TGF- $\beta$ , BMP, factores de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I, IGF-II), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), así como de osteoide (Donado, 2003), a un ritmo de 2 a 3  $\mu\text{m}$  por día y, para ello, los osteoblastos expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP) (Fernández et al., 2006). También producen factores que regulan la formación y la actividad de los osteoclastos (Marriott, 2013). Así, los osteoblastos son una fuente importante de activador del receptor de NF- $\kappa\text{B}$  ligando (RANKL) y la

osteoprotegerina (OPG), los reguladores críticos del desarrollo de los osteoclastos (Wada et al., 2006), controlando la diferenciación de osteoclastos mediante la expresión de RANKL en su superficie (Mediero y Bruce, 2013).

## **Osteocitos**

Son las células más abundantes del hueso en una proporción de 10 osteocitos por cada 1 osteoblasto (Fernández et al., 2006), comprendiendo más del 90% de las células dentro de la matriz o en las superficies óseas, con una vida en años, incluso décadas, pero no son capaces de reproducirse.

Tienen una morfología estrellada, disponiendo unas prolongaciones citoplasmáticas a través de los canaliculi, que permiten la transmisión de señales de y a los osteoblastos (Donado, 2003). Estas células se agrupan formando una única estructura interconectada, con una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes. Esta localización les permite tener un papel mecanosensor, funcionan como sensores de tensión y el estrés (Polo-Corrales et al., 2014), traduciendo, asimismo, señales de “estrés mecánico” en señales químicas (citoquinas), enviando éstas a la superficie iniciando así el proceso del remodelado óseo (Bonewald, 2011). Asimismo, secretan esclerostina, una citoquina que suprime la función osteoblástica (Reynaga, 2009) y juegan un papel importante en el metabolismo de fosfato y la disponibilidad de calcio (Bonewald, 2011).

Proviene de la diferenciación de osteoblastos (Donado, 2003) y se encuentran dentro del hueso, profundamente atrapados en la matriz mineralizada, al contrario que los osteoblastos y osteoclastos, que se hallan en la superficie ósea y están altamente conectados con las células sobre la superficie del hueso (Komori, 2013) y entre sí, a través de procesos citoplásmicos que irradian desde sus cuerpos y viajan a lo largo de los canaliculos que hay excavados en la matriz mineralizada (Lippuner, 2012), respondiendo a los cambios en las fuerzas físicas sobre el hueso y al daño, y transmitiendo señales a la superficie de las células a través de los procesos canaliculares (Martin, 2014). Son también una fuente importante de moléculas que influyen en el desarrollo y la actividad de los osteoclastos (Bellido et al., 2013), secretando una variedad de factores que regulan la diferenciación de los osteoclastos y los osteoblastos y la mineralización local, así como factores endocrinos que modifican la función renal (Jilka et al., 2013). Destacan de los osteocitos su papel regulador, no sólo de la homeostasis ósea y mineral, sino también la hematopoyesis. En la vida de un osteocito existen dos etapas; una etapa temprana (osteocito joven) en la que la célula es de menor tamaño, reside en el osteoide y no expresa la fosfatasa

alcalina y una fase tardía (osteocitos maduros) en el que la célula más grande re-expresa la fosfatasa alcalina y está profundamente arraigada en el hueso mineralizado (Divieti, 2013).

Las células mueren principalmente a través de una de las tres vías: la apoptosis, muerte celular y autofagia (Komori, 2013).

## **Osteoclastos**

Descritos por primera vez en 1873 (Hameed et al., 2014) y, estudiados en 1980 como células aisladas en cultivo (Martin, 2013), los osteoclastos son las células responsables de la resorción ósea, no nacen de las células madre mesenquimales sino de las hematopoyéticas, de las denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos (Fernández et al., 2006). Son células grandes, de (100  $\mu\text{m}$ ), multinucleadas (2- 100 núcleos/célula), ricas en mitocondrias y vacuolas, especializadas en la descomposición de tejido calcificado. Se encuentran en las llamadas lagunas howship (lagunas de resorción ósea en el tejido duro), disponiendo un borde en cepillo, donde tiene lugar la acidificación (Polo-Corrales et al., 2014). También tienen una zona de sellado donde enzimas del tipo Anhidrasa Carbónica, Hidrolasas lisosomales de Ph ácido, MMP-9 (Metaloproteínasa de matriz o Colagenasa I) (Ballesteros et al., 1999), logran una bajada del pH y favorecen la solubilización del calcio y fosfato, dejando al descubierto la matriz orgánica (Donado, 2003) a las enzimas proteolíticas, particularmente la catepsina K, que degrada la matriz orgánica, colágeno de tipo I, en pequeños péptidos (Gonçalves et al., 2013).

El factor común y esencial para promover la diferenciación de osteoclastos, así como su supervivencia y actividad, es el activador del receptor del ligando del factor nuclear-kappa B (RANKL) que se une a su receptor, RANK (Martin, 2014).

Los osteoclastos se diferencian mediante dos vías: una depende de la interacción con los osteoblastos y está relacionada con el proceso de degeneración y formación ósea que se produce durante el modelado fisiológico del hueso. La segunda vía, sin embargo, se relaciona con la pérdida de hueso en eventos patológicos, como la inflamación o traumatismo, y está controlada por las citoquinas. Los mediadores inflamatorios más importantes son la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa).

### 1.2.3 Osteoclastogénesis, sistema OPG/RANKL/RANK

En la osteoclastogénesis o proceso de inducción y de maduración de los osteoclastos, proceso que ocurre en la superficie ósea o cerca de la misma, el factor estimulante de colonias de macrófago (CSF-1), el receptor asociado a la activación del factor nuclear kappa-beta (RANK) o (Receptor Activador de NF-kB), perteneciente a la superfamilia de TNF (Hameed et al., 2014) y su ligando (RANKL), y la osteoprotegerina (OPG), desempeñan un papel importante a partir de células provenientes de la línea granulocito macrófago. Este proceso involucra por lo menos 24 genes a través del eje RANK/RANKL/OPG, cuya expresión diferencial regula la resorción y la densidad ósea (Mikán y William, 2007).

La osteoprotegerina (OPG), que la pueden sintetizar los osteocitos, también conocida como factor de inhibición de la osteoclastogénesis (OCIF) o como TNFRSF11B, descubierta simultáneamente por el grupo de investigación de (Amgen, Inc. Group, USA) y por (Snow Brand Milk Group, Japon), en 1997, tiene un papel muy importante en la osteoclastogénesis (Ferrer et al., 2002), siendo uno de los agentes que limitan la velocidad de diferenciación de los osteoclastos y la función (Zofkova, 2014), ya que puede bloquear la unión a las membranas de RANK y RANKL (Kitamura et al., 2013; Takahashi et al., 2011).

El ligando de la OPG es OPG-L, también conocido como ODF (factor de diferenciación de los osteoclastos) inducido por activación de receptores de células T, y el RANKL (ligando de unión al Receptor Activador de NF-kB) (Takahashi et al., 2014). El principal papel en el hueso de OPG-L es la estimulación de la diferenciación de los osteoclastos, su activación y la inhibición de su apoptosis. Junto al factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) son los dos factores necesarios y suficientes para completar todo el ciclo de maduración de los osteoclastos a partir de sus precursores inmaduros (Ferrer et al., 2002). El contacto de célula a célula entre las células osteoblásticas y progenitores de osteoclastos ha demostrado ser esencial para la inducción de la osteoclastogénesis (Miyazaki et al., 2014).

RANKL induce específicamente y de forma potente al maestro regulador de la diferenciación de osteoclastos, el factor nuclear de células T activadas citoplasmáticas 1 (NFATc1) (O'Brien et al., 2013) y conlleva no sólo una reorganización en el citoesqueleto del osteoclasto y cambios fundamentales para su activación, movilidad y establecimiento en la superficie ósea a resorber, sino que desencadena una señal de supervivencia en el osteoclasto maduro.

La interacción entre OPGL liberado por los osteoblastos y/o células del estroma, y su receptor RANK expresado en los precursores osteoclásticos, y para la cual la OPG actúa como receptor señuelo secuestrando a OPGL y evitando la activación de RANK, es fundamental para un correcto desarrollo de la osteoclastogénesis, no sólo para la diferenciación de los precursores hematopoyéticos hasta osteoclastos maduros, sino también para la fusión de los osteoclastos

mononucleares comprometidos entre sí para formar osteoclastos multinucleados, así como para activar a los osteoclastos maduros (Ferrer et al., 2002; Martin, 2013). La eliminación genética de RANKL en modelos animales conlleva a una ausencia completa de osteoclastos y un fracaso de erupción de los dientes, un proceso que impulsan los osteoclastos (Weitzmann, 2013). La inhibición de la señal de RANKL / RANK en el hueso puede aumentar la masa ósea, siendo útil para el tratamiento de la osteoporosis, de hecho, el anticuerpo neutralizante anti-RANKL humano (denosumab) se ha utilizado clínicamente para la osteoporosis y trastornos óseos relacionados con el cáncer (Yasuda, 2013).

#### **1.2.4 Proteínas óseas, colágenas y no colágenas. Hormonas del tejido óseo**

El hueso es un nanocompuesto jerárquicamente estructurado que consta de mineral y, por otro lado, la matriz orgánica. La fase mineral presenta un (85%) en forma de hidroxapatita (Polo-Corrales et al., 2014) el cual confiere al hueso rigidez, flexibilidad y resistencia, gracias a su unión con las fibras de colágeno (Giribone y Catagnetto, 2013), también está compuesto de carbonato de calcio (10%), fluoruro de calcio (2-3%) y fluoruro de magnesio (2 -3%).

La **matriz orgánica** se compone de fibrilar (principalmente colágeno I) (Sroga y Deepak, 2012) en un 90% y, el otro 10%, está integrado, en un 5%, por proteínas no estructurales como osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas (Giribone y Catagnetto, 2013), 2% de lípidos en peso, que son importantes para la función celular, regulando el flujo de iones y moléculas de señalización dentro y fuera de la célula y, por último, agua (Boskey, 2013).

El **colágeno de tipo I** es la proteína más abundante en la matriz ósea extracelular, su estructura molecular tiene la configuración espacial de triple hélice, cada una formada por el enrollamiento de 3 cadenas unidas entre sí (dos cadenas de amino-ácidos idénticos y uno que es diferente) con uniones intramoleculares y extramoleculares, manteniendo el entrecruzamiento molecular, lo que les da la resistencia al impacto al que son sometidas (Bernales et al., 2004). Distintas hormonas, citocinas y factores de crecimiento regulan la síntesis del colágeno (Zanchetta y Talbot, 2001). Entre las funciones del colágeno se encuentran: proveer propiedades mecánicas y servir de “estructura” para que los cristales se ordenen correctamente, proporcionar elasticidad a los tejidos, estabilizar la matriz extracelular, apoyar la deposición mineral inicial y unirse a otras macromoléculas (Boskey, 2013).

El colágeno **tipo III**, forma fibras y regula el diámetro de las mismas. El **tipo V** sirve como plantilla para el colágeno tipo I y el tipo VI. Además de colágeno, la matriz ósea tiene aproximadamente de 180 a 200 **proteínas no colágenas** (PNC), destacando las más importantes (Sroga y Deepak, 2012):

La **osteocalcina**, o BGP (por sus siglas en inglés Bone Gla Protein), se sintetiza exclusivamente por los osteoblastos (Sroga y Deepak, 2012), proteína de baja masa molecular, presente en hueso alveolar, cemento radicular y subpoblaciones del ligamento periodontal (Heinegard y Oldberg, 1989). Participa en el andamiaje junto con el colágeno de tipo I para la deposición mineral, también regula la maduración de los cristales de hidroxapatita y su tamaño, teniendo también un papel en el reclutamiento de los osteoclastos, participando en la remodelación ósea (Villarreal et al., 2013).

**Osteopontina.** La osteopontina tiene acción inhibitoria sobre la calcificación. Es una fosfoproteína ácida que normalmente se encuentra en los tejidos mineralizados, tales como huesos y dientes, así como en los revestimientos epiteliales del riñón y del cuerpo (Shahrzad, 2011). Constituye un 1% a 2% de las proteínas no colágenas en un hueso sano. Regula la formación de hueso y la resorción, junto con el colágeno de tipo I forma andamio para la deposición mineral, controla la cristalización (Sroga y Deepak, 2012).

**Osteonectina.** Estudios de unión in vitro han revelado que la osteonectina tiene una alta afinidad por el calcio, colágeno e hidroxapatita, siendo para ésta última seis veces más fuerte que la osteocalcina (Sauk y Somerman, 1991). La osteonectina apoya la remodelación ósea, regula el diámetro de las fibras de colágeno, la proliferación celular y de las interacciones célula-matriz, también regula el crecimiento de los cristales de hidroxapatita y controla su tamaño (Sroga y Deepak, 2012).

**Fibronectina.** La fibronectina es una proteína adhesiva, que se encuentra libre en el plasma y constituye uno de los principales componentes de la matriz extracelular. En la región aminoterminal de la molécula de fibronectina se ha identificado un dominio que tiene afinidad por gelatina y colágeno tipo I (Lucena et al., 2007). Esta proteína regula la diferenciación de osteoblastos y la supervivencia, la proliferación y diferenciación celular, también regula indirectamente la mineralización mediante la unión a otras proteínas de la matriz y la modificación de sus actividades (Sroga y Deepak, 2012).

## **Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP)**

Descubiertas por el cirujano ortopédico Dr. Marshall Urist (Lo et al., 2012), dirigen y regulan los procesos de reparación de fracturas gracias a la cascada de señalización que surge de la unión de las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP) a sus receptores de la superficie celular en células mesenquimales (Rivera et al., 2004; Jain et al., 2013). Promueven, en el sitio del defecto óseo, también presentes en periostio del callo de fractura (Kloen et al., 2003) la proliferación y diferenciación de las células mesenquimales indiferenciadas en cartílago o en osteoblastos (Wilson et al., 2013), promoviendo la producción de matriz ósea y la síntesis de proteínas colágenas y no colágenas (Rivera et al., 2004). Las señales se envían a través de proteínas específicas al núcleo celular y, a continuación, se produce una expresión de genes que conducen a la síntesis de macromoléculas que participan en la formación de cartílago y hueso (Jain et al., 2013). Gracias a los avances de la biología molecular y genética, más de 20 BMPs han sido identificados y algunos BMP humanos se han clonado INFUSE® (rhBMP-2, Medtronic, Minneapolis, MN) y OP-1™ (rhBMP-7, Stryker Biotech, Hopkinton, MA). En cirugía oral, rhBMP participa en la inducción de formación de hueso nuevo en la zona en que falta un diente (Lo et al., 2012).

A nivel dental la BMP2, BMP4, BMP6, BMP7 y GDF11 se expresan durante la diferenciación de los odontoblastos; mientras que la BMP4 y BMP5 durante la diferenciación de los ameloblastos (Munevar et al., 2008). Sin embargo, no todos los miembros de la familia BMP inducen la formación de hueso o diferenciación (Otsuka, 2013), si bien, específicamente, BMP-2, -4, -6, -7, -9 y -14 han demostrado tener propiedades osteogénicas significativas (Roberts y Andrew, 2012), en contraste, la BMP-3b inhibe el proceso de diferenciación de osteoblastos y antagoniza las acciones de BMP-2 (Otsuka, 2013).

## **Hormonas más importantes que influyen en la resorción ósea**

En la fisiología ósea cabe destacar el papel de las hormonas. La vitamina D3, 1,25(OH)<sub>2</sub> o calcitriol, se metaboliza primero a 25-hidroxivitamina D3(25(OH)D3) en el hígado y luego a 1α, 25-dihidroxivitamina D3(1α,25(OH)<sub>2</sub>D3) en el riñón. 1α,25(OH)<sub>2</sub>D3 es ahora reconocida como una hormona esteroide que tiene un papel en el mantenimiento de la homeostasis del calcio a través del receptor de la vitamina D (VDR) (Takahashi et al., 2014). Los metabolitos de la vitamina D, calcitriol, son potentes estimulantes de la resorción y de la formación de osteoclastos, induciendo también la secreción de IL-1 y 6 por parte de los osteoblastos (Ballesteros et al., 1999).

PTH (parathormona), es un estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF-β (Fernández et al., 2006), también modula la función del osteoclasto actuando directamente sobre él o por medio del osteoblasto, mediante la secreción de IL-6 (Ballesteros et al.,

1999) y controla la homeostasis del calcio a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino.

La calcitonina inhibe, de forma transitoria, la reabsorción ósea reduciendo el número y actividad de los osteoclastos.

Las hormonas tiroideas manifiestan acciones contrapuestas sobre el hueso, pueden estimular la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis de IGF-I o bien puede aumentar el número y función de los osteoclastos, estimulando la reabsorción ósea (Fernández et al., 2006).

### 1.3 Funciones y características del hueso

Lejos de tener un papel inerte, el hueso es un tejido del que destacamos su dinamismo y su constante renovación a base de un equilibrio entre la aposición y reabsorción ósea (un 5% del hueso cortical y un 20% del trabecular al año), lo que representa una renovación de un 5-10% del hueso total anualmente (Suárez, 2012). Hay que distinguir entre el modelado óseo, que impulsa el crecimiento del esqueleto, y la remodelación ósea, responsable del mantenimiento de huesos sanos en la edad adulta (Teti, 2011).

El hueso presenta una excelente capacidad para mantener íntegra su estructura cuando sufre injurias. Sin embargo, no siempre puede hacer frente a la reposición del defecto de manera exitosa. Ahí es donde podemos intervenir, mediante biomateriales, intentando que el tejido sea anatómico y funcionalmente idéntico al afectado por la enfermedad, pérdida de piezas dentarias o desequilibrio óseo, para recuperar la función y/o estética perdida. Cuando se realiza un injerto lo que se pretende es la formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, sea idéntico al preexistente (Fernández et al., 2006). Esto también se puede aplicar a otros casos, por ejemplo, para mejorar la celeridad de la reparación ósea o cuando el defecto óseo tiene un tamaño tan grande que por sí sólo no puede el tejido óseo regenerarlo en su totalidad (Zwingerberger et al., 2012), no pudiendo seguir los procesos de reparación normales vía osificación endocondral, y creando lo que se denomina fractura de no unión.

Se pueden atribuir a los huesos cuatro funciones básicas. **Estructural**, protegiendo órganos vitales, **locomotora**, proporcionando soporte para la movilidad del cuerpo, cuyo comportamiento biomecánico del hueso resulta extremadamente complejo debido a su carácter heterogéneo, anisotrópico y viscoelástico, variando sus propiedades biomecánicas en función de la dirección en la cual se aplica la fuerza (Guede et al., 2013), **hematopoyética**, produciendo componentes esenciales para la diferenciación y supervivencia de células madres hematopoyéticas y, finalmente, **como almacén**, sirviendo como reservorio de calcio, fosfato, magnesio y otros iones, al igual que células madres mesenquimáticas y hematopoyéticas (Buckwalter et al., 1996), las

cuales participan en la regulación de la diferenciación celular, en la integridad y función del tejido óseo (Alvarez, 2009).

#### **1.4. Densidad ósea, importancia en la Implantología y formas de medirla**

Las propiedades mecánicas de los huesos están relacionadas con su estructura, composición y mineralización, y cada una de ellas está vinculada con la densidad del hueso (Ramírez et al., 2013).

En medicina, la densidad es determinante para valorar la salud ósea. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la presencia de osteoporosis cuando la densidad mineral ósea sea menor de un valor 2,5 desviaciones estándar (DE) por debajo del pico normal de masa ósea (Guerra et al., 2015).

En implantología oral, la densidad ósea es uno de los factores de osteointegración y éxito implantológico más importante. Su evaluación es de máxima importancia, ya que tradicionalmente se han utilizado las clasificaciones de Lekholm-Zarb y Misch, técnicas empíricas y subjetivas según la experiencia del cirujano, pero necesitamos técnicas más objetivas (Merchán S et al., 2015). La densidad influye en el pronóstico del implante; así, en el hueso de baja densidad o tipo IV las tasas de supervivencia son menores (entre 50-94% según los autores) en comparación con los otros tipos de hueso (Martínez-González JM et al., 2002). La densidad del hueso es mayor en las zonas anterior y posterior mandibulares y en la anterior maxilar y es menor en la zona posterior maxilar (Corona M et al., 2015).

En implantología, el uso de tomografía como herramienta para la obtención de valores numéricos de densidad, es cada vez más común. Así, podemos valorar, de manera no invasiva, la interfase hueso-implante por ejemplo, o la acción de los osteoblastos que pueden generar un aumento local de la densidad del hueso, debido, por ejemplo, a los esfuerzos mecánicos sobre la zona. En esta línea, estos últimos años, varios artículos se han publicado tras la utilización de la micro-TC para el estudio de calidad ósea. Fanuscu et al., Guldborg et al., Takada et al., Chopra et al., han estudiado parámetros como Bone volume density (Densidad de volumen ósea), Trabecular Thickness (Espesor trabecular), Trabecular separation (Separación trabecular), Trabecular number (Número trabecular), Structural model index and Connectivity density (índice de modelo estructural y densidad de conectividad) (Peroti-Abad JA et al., 2015). Estos trabajos muestran la micro-TC como un instrumento prometedor, siendo necesarios más estudios con este sistema no invasivo que protocolicen la correlación de los distintos parámetros que nos aporta esta técnica con un criterio global de éxito o fracaso en la osteointegración, de ahí que el objeto de nuestro estudio sea analizar los cambios de densidad que ocurren tras la colocación del biomaterial.

En el área de patología bucal y maxilofacial la TC se ha hecho particularmente necesaria para el estudio de lesiones intraóseas, tanto tumorales como quísticas, valorando la densidad de la zona, correlacionándolo con el diagnóstico histopatológico, si bien el TC debe emplearse como examen complementario (Dellán A et al., 2015). Las medias de unidades Hounsfield (HU) más altas fueron observadas en displasia ósea y odontoma (1732,4/1698/1707,5 y 1582,9/1523/1512,9 HU respectivamente). El tumor odontogénico quístico queratinizante mostró valores medios alrededor de -15 HU.

Para la displasia ósea los valores fueron de 1695 a 1731 HU y el odontoma compuesto de 1502 a 1577 HU. Por otra parte, los ameloblastomas obtuvieron un rango de 9 a 106 HU (Tabla 1).

Diagnóstico	≈ Perfil de Densidad (UH)
Ameloblastoma	9 - 106
TOQQ	- 217 - 188
Odontoma compuesto	1502 - 1577
Quiste dentígero	32 - 168
Quiste periapical	38 - 51
Quiste odontogénico glandular	24 - 26
Quiste óseo simple	27 - 59
Osteoma esponjoso	357 - 382
Osteitis condensante	770 - 1077
Displasia ósea	1695 - 1731
Fibroma osificante central	74 - 664
Hemangioma	17 - 224
Histiocitosis	90 - 139
Querubinitis	43 - 90
Talasemia	116 - 175

Tabla 1. Perfil de densidad por grupo de lesión (Dellán A et al., 2015)

Para evaluar la densidad ósea se han aplicado varias **técnicas radiológicas**:

La **radiografía convencional**, la cual es poco sensible para valorar la densidad ósea ya que sólo refleja grandes disminuciones de la masa ósea (superiores a un 30%). Además, representa objetos de 3D con imágenes en 2D, con una superposición de estructuras. Valoraríamos la densidad de forma fotográfica, clásicamente se describen: aire, grasa, agua, hueso y metal. Esta valoración visual, además del componente subjetivo que conlleva, está influenciada por otros factores, como el tiempo de exposición, el miliamperaje, el kilovoltaje, la distancia tubo-película, el tamaño del punto focal, la colimación, la filtración, el tipo de película, las pantallas intensificadoras y la técnica de revelado y fijado.

Una variación de la anterior, donde se digitaliza la imagen analógica obtenida con el aparato de rayos X y el programa informático la convierte en números y dígitos es la **radiografía digital**. Aquí sí podemos medir la densidad ósea, basada en una escala de grises, de tres formas: como información estadística numérica, como un histograma que muestra la distribución de la densidad y como un perfil de la misma (Digora ®, Dent-a-View ®, Trophy- Window ®).

La **Absorciometría radiológica de doble energía (DXA)** pertenece al grupo de las técnicas densitométricas por absorciometría, que pueden ser fotónicas o radiológicas y dobles o simples. Se usa mucho para cuantificar la densidad ósea de la columna lumbar y el tercio proximal de fémur. En el área bucal su mayor limitación es su falta de capacidad para distinguir la densidad de hueso trabecular y cortical debido a que la DXA proyecta las tres dimensiones del hueso en modo de dos.

Con la **ultrasonografía cuantitativa** aplicamos un sistema no invasivo, inocuo y sin radiación, ya que empleamos ultrasonidos, que son ondas con una frecuencia elevada. Si bien se ha desarrollado, su uso está limitado a la investigación clínica en densitometría ósea, para la estimación de la DMO en el estudio de la osteoporosis.

La **resonancia magnética** tiene como ventaja sobre la Tomografía Computerizada que no es invasiva y no se emplea radiación, ya que se basa en el empleo de ondas electromagnéticas de energía muy baja que originan la resonancia de los núcleos de los átomos de hidrógeno presentes en el agua y las grasas del cuerpo humano. Sin embargo, no se emplean en implantología debido a que el hueso no tiene señal de resonancia, creando confusión con estructuras como el aire o el tejido cicatricial, que tampoco tienen señal.

Con la **Tomografía Computerizada (TC)**, la cual ha desplazado a la Tomografía Convencional, conseguimos imágenes en 3D con el área explorada reflejado en un volumen constituido por una matriz de vóxeles, sin superposición de estructuras y una densidad expresada en HU. Existen tres tipos de TC: la TC médica, la TC dental o CB-CT (*Cone Beam Computerized Tomography*) y la micro-TC (Merchán S et al., 2015).

La TC médica fue presentada en 1972 por el ingeniero británico **Hounsfield**, premio Nobel por este motivo, en 1979. La tomografía axial dispone de unos elementos fundamentales que son, el tubo de rayos X, el cual emite un haz colimado que atraviesa al paciente, el sistema de detectores que sustituyen a la placa radiográfica y recibe el haz atenuado procedente del tubo de Rx y el ordenador o sistema informático, que reconstruye la imagen (digital) y la muestra en un monitor tras complicados cálculos matemáticos.

Cada corte de la TC contiene un número de elementos volumétricos, en el monitor se representan imágenes bidimensionales o píxels (*picture element*), que es el menor elemento a partir del cual se reconstruye una imagen de estos elementos de volumen o voxels (*volume element*), que es el volumen de esa mínima unidad; el cual está dado por el espesor del corte (0,1 mm.) Es decir, cada píxel es la representación de un volumen tridimensional. Como cada tejido tiene un nivel de absorción de radiación diferente, lo cual se refleja en el amortiguamiento de los rayos X que lo atraviesan, tendremos distintos coeficientes de atenuación de la radiación en cada voxel, asignando a cada uno de ellos un valor numérico o número TC.

A las HU se les asigna un valor arbitrario, siendo 0 la densidad del agua. La grasa posee valores negativos (en torno a -70 o -90 HU) y los tejidos blandos valores positivos (+ 30, + 70 HU) (Hernández y Mitjavila, 2006). En los extremos de la escala se sitúan la densidad de hueso (+ 500 HU) y del aire (-1.000 HU). En los primeros aparatos había 2.000 valores, con un intervalo desde el -1.000 hasta el +1.000, en los de última generación hay 4.100 valores, con un intervalo desde el -1.024 hasta el +3.076.

En Cirugía Bucal e Implantología la técnica densitométrica más exacta es TC cuantitativa o *Quantitative Computerized Tomography* (QCT).

## Clasificación de Norton y Gamble basada en el análisis óseo por medio de TC y las HU

Misch (1993) y (Engquist et al., 1988) establecieron un procedimiento operatorio en Implantología en función a una clasificación, complementando a la de (Lekholm & Zarb 1985), que se basaba en la percepción de la calidad ósea de forma subjetiva. Por este motivo, en 2001 Norton y Gamble elaboraron una clasificación basada en el análisis óseo por medio de TC y HU como respuesta a la necesidad de una clasificación objetiva y cuantitativa de la densidad ósea que se puede aplicar preoperatoriamente y que no depende de la experiencia del operador.

	Q1 Bone density (HU)	Q2 Bone density (HU)			Q3 Bone density (HU)	Q4 Bone density (HU)	
	968	731	809	612	880	457	879
	866	590	804	319	529	204	933
	892	397	604	609	594	242	699
	710	435	675	723	1105	478	452
	964	138	378	514	606	773	680
	686	609	355	694	864	455	331
	1421	784	797	556	818	622	461
	1021	659	496	1396	656	274	500
	1140	666	772	1030	609	666	642
	1003	1283	446	453	755	1232	502
	690	800	827	765	1069	608	1244
	1057	1326	622	956	565	1176	457
		636	903	535	503	905	534
		1205	898	678	1302		231
		1291	559	696	466		394
		400	666	279	975		404
		1018	518	171	778		457
		996	308	502	730		151
		1125	652	322	658		128
		935	851		397		98
		1167	838		404		213
		941	656		696		199
		700	737		492		77
		629	873		453		
	n=12			n=67		n=37	n=23
Mean	951.5			706.2		675.6	463.7
SD	209.6			275.9		281.7	290

Tabla 2. Medidas de densidad (Norton Mr et al., 2001)

Se hicieron un total de 32 exploraciones con TC, tanto en desdentados totales como parciales, estableciendo un rango cuantitativo (HU) para las cuatro regiones quirúrgicas (Norton Mr et al., 2001): mandíbula anterior, anterior maxilar, mandíbula posterior, posterior maxilar y correlacionaron estos resultados con las cuatro poblaciones de hueso establecidas, según Lekholm & Zarb (Tabla 2 y 3).

Quality (Lekholm & Zarb)	Bone density range (HU) (Norton & Gamble)	Region of interest
Quality 1	>+850	Anterior mandible
Quality 2/3	+500 to +850	Posterior mandible/anterior maxilla
Quality 4	0 to +500	Posterior maxilla
Quality 4*	<0	Tuberosity region

Tabla 3. Clasificación según Norton y Gamble clasificación basada en el análisis óseo por medio de Tomografía Computerizada (TC) y las unidades Hounsfield (HU).

## 1.5. Flavonoides

### 1.5.1 Consideraciones generales sobre los flavonoides

Los flavonoides, del latín flavus, “amarillo”, (Álvarez, 2010) están presentes en la naturaleza durante más de mil millones de años (Estrada-Reyes et al., 2012), descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares (Martínez-Flórez et al., 2002). Este es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios producidos por las plantas, de los cuales se han identificado más de 10.000 compuestos (Kozłowska y Szostak-Wegierek, 2014). Al principio se denominaron vitamina P (por su permeabilidad) y también vitamina C2, sin embargo, ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Álvarez, 2010). El número de estos compuestos se incrementa conforme avanza la ciencia, así, el número total de nuevos flavonoides informados en 2007-2009 se incrementó en más de un 30% en comparación con los tres años anteriores (Veitch, 2011). Sin embargo, a pesar de que los flavonoides se han estudiado durante unos 50 años, los mecanismos celulares involucrados en su acción biológica aún no se conocen totalmente (Benavente-García y Castillo, 2008).

Los flavonoides, la clase más importante de compuestos fenólicos, se encuentran en una forma no glicosilada (aglicona) o unidos a una molécula de azúcar (glucósido) (Lago et al., 2014; Cartaya y Reynaldo, 2001). Están disponibles de forma abundante en la naturaleza como micronutrientes en la dieta animal (Moreno et al., 2004), siendo los antioxidantes más abundantes en la dieta humana, y están presentes de forma generalizada en frutas y bebidas, como el té, café y vino, también en frutos secos, semillas, hierbas, especias, vino tinto, verduras, granos, cortezas, raíces, flores y tallos (Palaska et al., 2013; Lago et al., 2014).

Los polifenoles tienen una amplia variedad de funciones fisiológicas en plantas (Lago et al., 2014), además de aportar rasgos fenotípicos como fragancia, sabor y color (Drago, 2007) siendo este último aspecto importante para favorecer la polinización (Escamilla et al., 2009). Los flavonoides muestran un papel de señal química o marcadores florales, facilitando indirectamente la polinización (figura 1) al guiar a las abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar.



Figura 1. Abeja polinizando

Otras veces, estimulan la ovoposición indicando al insecto un lugar apropiado de la planta para depositar sus huevos (Cartaya y Reynaldo, 2001). Así, por ejemplo, flavonoides como la antocianina en flores atraen a los insectos polinizadores y son responsables de los característicos colores rojo y azul de las bayas, vinos y ciertas verduras (Heim et al., 2002).

También tienen efecto sobre las enzimas, así, gracias al control que ejercen de los niveles de las auxinas (hormonas vegetales), responden a la luz (Martínez-Flórez et al., 2002), están involucrados en el transporte de electrones en la fotosíntesis, que actúa como un antioxidante contra los efectos de la luz ultravioleta (Lago et al., 2014), confiriendo resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol (Estrada-Reyes et al., 2012).

Tienen un efecto protector al proporcionar una inmunidad innata y resistencia contra agentes patógenos (bacterias, hongos y virus), radiaciones (Heim et al., 2002), enfermedades (Drago, 2007) y también protección contra insectos herbívoros (Lago et al., 2014). Los flavonoides exhiben, ingeridos por otros animales y humanos, entre otras, actividad antioxidante, antitumoral, antiinflamatoria, antimicrobiana y hormonal (Drago, 2007).

### 1.5.2 Estructura química, biosíntesis, clasificación

Los flavonoides pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30.000 Da (Pérez, 2003). Comprenden un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- $\gamma$ -pirano. Los anillos son denominados A, B y C (figura 2); los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números con tilde para el anillo B (Cartaya y Reynaldo, 2001). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2 al 6 (Russo et al., 2006).

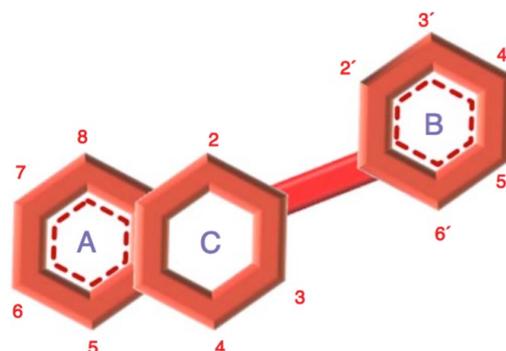


Figura 2. Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo (Escamilla et al., 2009)

Los flavonoides naturales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glucósidos (Cartaya y Reynaldo, 2001), en el que uno o más grupos de azúcar están ligados a los grupos fenólicos por enlaces glicosídicos (Kinoshita et al., 2006). Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como O-glucósidos, los mayoritarios, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente (Martínez-Flórez et al., 2002) con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), o como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono (Quiñones y Aleixandre, 2012), también se presentan con relativa frecuencia moléculas de flavonoides no unidos a restos de azúcar, conocidos como la forma aglicona (Cartaya y Reynaldo, 2001). Cuando se forman los glucósidos, el sitio de glicosilación preferido, en el caso de la molécula de flavonol, es la posición C-3 y, con menor frecuencia, la posición C-7 (Aherne y O'Brien, 2002). Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los flavonoides presentan una estructura común de dos anillos aromáticos conectados a tres átomos de carbono (Lago et al., 2014) que forman un anillo heterocíclico oxigenado (C6'C3'C6) (Schroeter et al., 2003; Luis y Aller, 2008). Mostrando con frecuencia la hidroxilación en las posiciones 5 y 7 y el anillo B y la oxidación en el 4', 3', 4', o 3', 4', 5'-posiciones (Lago et al., 2014). Así, éstos comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Russo et al., 2006), cada porción C6 es un anillo de benceno (Veitch, 2011).

La clasificación de los flavonoides en grupos principales se basa en la configuración y el estado de oxidación de la porción c3 de conexión de la molécula. El anillo de benceno al que el anillo de pirano (antocianidina) o el anillo pirona (flavona, etc) se fusiona se designa el "anillo A" y el otro anillo de benceno es el "anillo B".

Las características individuales de los flavonoides dentro de cada grupo principal se basa en el análisis del patrón de sustitución y de la naturaleza de los sustituyentes, siendo los grupos hidroxilo los más comunes y con frecuencia uno o más de ellos se utilizan en la formación de éteres.

Entre los alcoholes que participan en la formación de los éteres están el metanol (sustituyentes metoxilo resultantes) y azúcares (Veitch, 2011). De acuerdo a los sustituyentes presentes en estas tres estructuras cíclicas, se subdividen en función de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del anillo C, de la presencia o ausencia de un doble enla-

ce entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, y de la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B (Tenorio et al., 2006).

Si bien los compuestos individuales dentro de una clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B, los diversas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y el patrón sustitución del anillo C, clasificándose de esta manera (Kumar y Abhay, 2013; Álvarez, 2010) (figura 3):

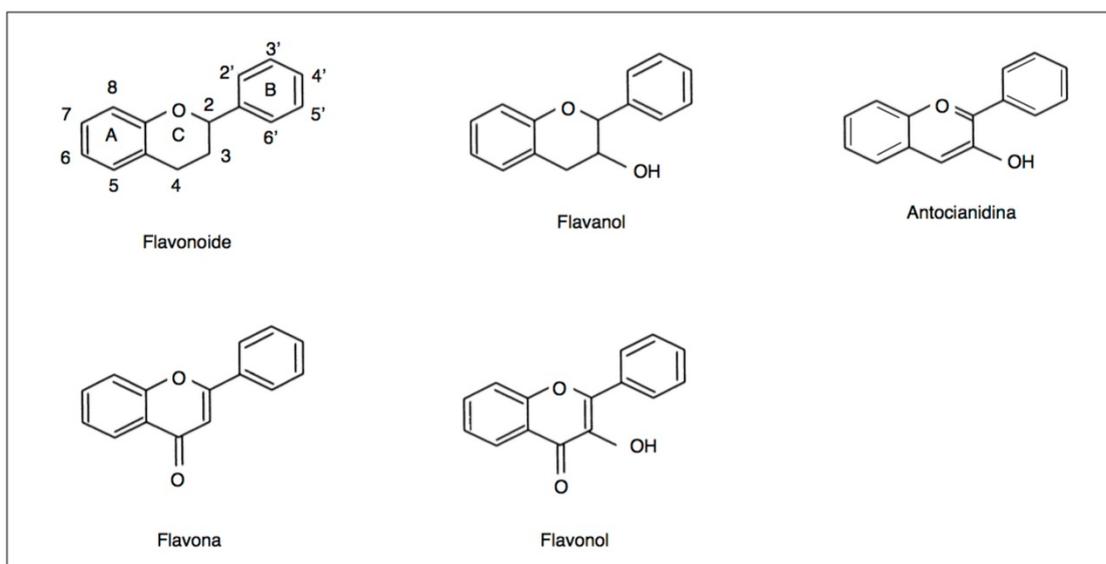


Figura 3. Diferentes tipos de flavonoides según la estructura (Martínez-Flórez et al., 2002)

flavonas, por ejemplo, apigenina, luteolina (Kumar y Abhay, 2013) y la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3 (Martínez-Flórez et al., 2002), flavonoles, por ejemplo, kaempferol, miricetina, fisetina (Kumar y Abhay, 2013) y quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C (Martínez-Flórez et al., 2002), flavanoles como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C, flavanonas, por ejemplo, hesperetina, y naringenina (Kumar y Abhay, 2013), isoflavonas y antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Huxley et al., 2004). Influye la posición de sustitución del oxígeno del carbonilo y el grupo fenilo (anillo B) y el orden de enlace entre los átomos 2 y 3 en el anillo C. Mientras flavanones y flavanoles tienen un enlace sencillo entre los átomos 2 y 3, flavonas, flavonoles, isoflavonas y antocianidinas tienen un doble enlace o aromático allí (Kinoshita et al., 2006) (Tabla 4). El patrón de la conjugación, glicosilación, o metilación puede ser muy compleja, puede modificar el carácter hidrófilo de la molécula y sus propiedades biológicas, y notablemente aumentar el peso molecular del flavonoide (Aherne y O'Brien, 2002).

Se pueden distinguir entre compuestos que poseen un radical cetónico en el heterociclo: flavonas, flavonoles, flavanonas (dihidroflavonas) y calconas, y los que no lo poseen: flavanoles y antocianidinas. Otra característica común a antocianidinas, flavanoles y flavonoles es la existencia de un hidroxilo en posición 3. Dentro de cada uno de estos grupos los compuestos se diferencian entre sí por los sustituyentes en el anillo B y por los sustituyentes en los diferentes hidroxilos de la molécula (metilos, azúcares y/o ácidos orgánicos, más habitualmente) (Rivas y García, 2002)

Flavonoide	Estructura anillo C	Parte de sustitución
Flavanona	naringina	5,4'-OH;7-O-Neo <sup>a</sup>
	hesperidina	5,3'-OH;4'-OMe <sup>a</sup>
	eriodictiol	5,7,3',4'-OH
Flavona	tangeritina	5,6,7,8,4'-OMe <sup>a</sup>
	luteolina	5,7,3',4'-OH
	apigenina	5,7,4'-OH
Flavonol	kaemferol	5,7,3,4'-OH
	guercetina	5,7,3,3',4'-OH
	rutina	5,7,3',4'-OH;3-o-Rut <sup>a</sup>
Isoflavonoides	genisteina	5,7,4'-OH
	diadzeina	7,4'-OH
	orobol	5,7,3',4'-OH
Antocianidinas	apigenidina	5,7,4'-OH
	luteolinidina	5,7,3,4'-OH
	cianidina	3,5,7,3',4'-OH
Auronas	sulfuretina	6,3',4'-OH
	leptosidina	6,3',4'-OH;7-OMe <sup>a</sup>

Tabla 4. Ejemplos de flavonoides, su estructura y parte de sustitución (Cartaya y Reynaldo, 2001)

## Flavonas y flavonoles

Ambos tipos de compuestos poseen un grupo cetona en posición 4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3 del anillo C; los flavonoles presentan, además, un grupo hidroxilo en C3. Se encuentran habitualmente en los tejidos vegetales bajo la forma de heterósidos (glucósidos, galactósidos, ramnósidos, rutinósidos o glucuronósidos). La posición más frecuente implicada en la glicosilación es la 3, aunque también pueden darse en 5 y 7 y el azúcar más frecuente es la glucosa.

## Flavanoles

Los flavanoles presentan estructuras derivadas de tres esqueletos básicos: flavan-3-ol, flavan-4-ol y flavan-3,4-diol, con diversos sustituyentes hidroxilo en su anillo B. En la naturaleza se pueden encontrar como monómeros o condensados entre sí, formando compuestos con diverso grado de polimerización.

## Flavan 3-ol monómeros

Se les suele designar genéricamente como “catequinas” y se diferencian entre sí según el grado de hidroxilación de su anillo B. En su estructura poseen dos carbonos asimétricos (C2 y C3), lo que hace posible la existencia de isómeros ópticos (Rivas y García, 2002).

La biosíntesis de la unidad C6C3C6, deriva de dos rutas separadas. Los anillos A provienen de la condensación de dos unidades malonil coenzima A y acetil coenzima B y los átomos de carbono 2, 3 y 4, y deriva del ácido cinámico. El primer intermediario estable es la chalcona. Los pasos subsecuentes conducen a la formación de varios flavonoides, los cuales controlan los patrones de hidroxilación, los niveles de oxidación, las posiciones de O-metilación y la glicosilación (Mabry et al., 1970; Albornoz, 1980).

Los distintos tipos de flavonoides tienen una ruta biosintética común, que incorpora precursores de las rutas del shiquimato y la acetato-malonato para, posteriormente, sufrir modificaciones en varios estados, lo que se traduce en la extensión de la hidroxilación, metilación, isoprenilación, dimerización y glicosilación, produciendo O y C-glicósidos (Cartaya y Reynaldo, 2001).

### 1.5.3 Fuentes y métodos de obtención de flavonoides cítricos

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes de la dieta, siendo su presencia 10 veces mayor que la de vitamina C y 100 veces mayor que la de vitamina E o carotenoides (Luis y Aller, 2008). Los flavonoides se encuentran principalmente en frutas, granos, cortezas, vegetales, raíces, flores, vino, y los tallos (Sankari et al., 2014) té verde, té negro, soja así como vino (con un promedio de 2,57 g/l para el vino tinto y de 0,16 a 0,3 g/l, con un promedio de 0,24 g/l para el vino blanco, dependiendo su cantidad y tipo principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las practicas de cultivo) y cerveza, donde destacan los flavonoides polihidroflavanos (catequina y epicatequina), los antocianógenos (leucocianidina o leucopelargonidina) y los flavonoles (grupo de quercitinas: kaempferol o mirecitina) (Martínez-Flórez et al., 2002). La distribución de los flavonoides en el reino vegetal, aparte de la planta en sí, depende de varios factores, orden, familia, e incluso existen variaciones dentro de las especies, así, por ejemplo, en pomelos y naranjas tanto amargas como ácidas predomina la naringina, mientras que la hesperidina se encuentra principalmente en naranjas, limones y varias clases de mandarinas. La quercetina y kaempferol son los flavonoles más comunes en los alimentos (Myburgh y Kathryn, 2014).

Algunos polifenoles son específicos de determinados alimentos (flavanonas en cítricos, isoflavanonas en soja). Otros, como la quercetina, se pueden encontrar en un gran número de plantas (frutas, vegetales, cereales, leguminosas, té, vino, etc.). Generalmente, los alimentos contienen una mezcla compleja de polifenoles (Quinones y Aleixandre, 2012).

Por debajo de la superficie del suelo sólo existen pequeñas cantidades de flavonoides en partes de la planta, con la notable excepción de las cebollas (Aherne y O'Brien, 2002). La mayoría de ellos (a excepción de las catequinas) está presente en las plantas y alimentos en forma de  $\beta$ -glicósidos (Estrada-Reyes et al., 2012) tanto alfa o beta, tales como flavonoides glucósidos, galactósidos, rhamnosidos, arabinósidos y rutinósidos (Fang et al., 2013; Pugliese et al., 2013; Taheri et al., 2013).

El consumo es variable dependiendo de la región geográfica y cultura, variando la dieta y hábitos alimentarios dentro de los países (Sankari et al., 2014). Si en Italia una importante fuente de flavonoides es el vino tinto (Ailsa y Hardcastle, 2014), en Finlandia, lo son las frutas y verduras (Aherne y O'Brien, 2002) el té es la fuente fundamental de flavonoides en Japón. Si bien el consumo en la dieta occidental de los flavonoides mixtos está a una razón de un gramo diario (Sankari et al., 2014), se estima en 23 mg al día en los Países Bajos (Heim et al., 2002).

A la hora de calcular la cantidad de flavonoides en la dieta, nos encontramos con el obstáculo de la heterogeneidad de criterios metodológicos aplicados en los estudios, con lo que los resultados de los cálculos son variables, influyendo también el lugar objeto de estudio. Como ejemplos, sírvanse estos lugares (Escamilla et al., 2009):

EEUU, 190 mg/día (Chun et al., 2007).

Finlandia, 24,2 a 26,7 mg/día (Knekt et al., 2002).

Japón, 63 mg/día (Arai et al., 2000).

Australia 454 mg/día (Johannot y Somerset, 2006).

Occidente, 100-150 mg/día, sin contar antocianinas y proantocianidinas (Beecher, 2003; Manach et al., 2004).

Si bien los flavonoides contenidos en los alimentos han sido hasta ahora tratados como componentes de los alimentos adversos debido a que a veces inhiben las enzimas digestivas (Kinoshita et al., 2006) se estima que su consumo en la dieta es seguro (Kozłowska y Szostak-Wegierek, 2014). La baja solubilidad de agliconas de flavonoides en el agua unido a su corto tiempo de residencia en el intestino, así como su menor absorción evita a los seres humanos efectos tóxicos agudos cuando los consumen, con la excepción de una modalidad rara de alergia (Kumar y Abhay, 2013) aunque muchas personas rechazan la ingesta de estas moléculas por su sabor amargo y carácter astringente (Kinoshita et al., 2006). El uso de los productos farmacéuticos que contienen altas dosis de sustancias bioactivas como una fuente alternativa

de flavonoides a los obtenidos de la dieta está aumentando, algunas de estas sustancias son de origen natural como naringenina (soporte femenina natural), Ginkgo Biloba y otras de origen sintético como flavopiridol, actualmente disponibles en el mercado (Singh et al., 2014) preocupando el hecho que no se conoce la toxicidad de fuentes concentradas de flavonoides, así como sus interacciones con otros componentes de la dieta o medicamentos que se toman (Kozłowska y Szostak-Wegierek, 2014).

En lo que atañe a los procedimientos de obtención, la estabilidad durante los procesos de extracción y purificación es debida a la alta resonancia que le confieren los anillos bencénicos; los flavonoides presentan una elevada estabilidad molecular, soportando bajas y altas temperaturas, hasta de 300°C. Pueden ser extraídos inicialmente con solventes orgánicos sin perder sus propiedades estructurales, y son muy estables al calor y a las reacciones de oxidación, resistiendo la mayoría de los tratamientos térmicos que se emplean en la manufactura de los alimentos enlatados (Badúj, 1996).

La mayor parte de los flavonoides está presente en las plantas y alimentos en forma de  $\beta$ -glicósidos, así que, una vez que son ingeridos y antes de entrar en la circulación general, los flavonoides sufren, antes de ser absorbidos, una hidrólisis en el lumen intestinal gracias a las enzimas lactasa phloridzina hidrolasa (LPH) y enzima  $\beta$ -glucocidasa citosólica no específica (CBG), ya que la unión  $\beta$  de estos azúcares resiste la hidrólisis de las enzimas pancreáticas (Estrada-Reyes et al., 2012). La glicosilación es el último paso en la biosíntesis de flavonoides y mejora o facilita la solubilidad, el almacenamiento y la estabilización de las agliconas de flavonoides (Jiang et al., 2008). El glicósido, tras ser separado de su aglicona, se absorbe rápidamente al tener mayor solubilidad en agua, sin embargo, la aglicona puede tardar hasta tres horas para ser absorbida (Escamilla et al., 2009). Los glicósidos que no son sustratos para la LPH o para el SGLT-1 son transportados hacia el colon donde son hidrolizados por las bacterias ahí presentes (Estrada-Reyes et al., 2012). El pico máximo de concentración de los flavonoides se da, como promedio, a las 1.75 horas, consiguiendo una distribución homogénea en todos los tejidos corporales.

Según la ruta por la cual se metabolizaron se excreta de una u otra forma. Se excretará por vía renal si el flavonoide es sólo glucuronidado (como la catequina), pero si es metilado y sulfatado será excretado por la vía hepática (como la quercetina) (Escamilla et al., 2009).

## 1.5.4 Efectos biológicos

Se ha atribuido un gran número de efectos biológicos a los flavonoides (Prasad et al., 2010; Amado et al., 2011; Hanrahan et al., 2011; Procházková et al., 2011; Dajas, 2012). Los datos epidemiológicos y médicos indican que los flavonoides en la dieta juegan un papel clave en la prevención y manejo de enfermedades neurodegenerativas (Scalbert et al., 2005; Letenneur et al., 2007), cáncer (García-Closas et al., 1999; Hillman et al., 2001; Gates et al., 2009) diabetes tipo II (Scalbert et al., 2005) y de enfermedades crónicas, como por ejemplo la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Andrae-Marobela et al., 2013; Delmas y Xiao, 2012; Deng et al., 2013; Georgiev et al., 2011, 2012; Johnson et al., 2013; Xiao, 2013).

### *Propiedad antioxidante*

Los radicales libres pueden atacar a los lípidos de la membrana, generar radicales de carbono y producir radicales peroxi que provocan la peroxidación de los lípidos, ya que son muy reactivos. La oxidación de las biomoléculas conlleva daño tisular, muerte celular o varias enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, trastornos neuronales, irritaciones de la piel e inflamaciones (Singh et al., 2014).

Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones (Quinones y Aleixandre, 2012), retirando el oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos, bloqueando la acción letal de dichas sustancias sobre las células.

Los flavonoides, como antioxidantes, actúan de dos maneras (Singh et al., 2014), gracias a sus excelentes propiedades de quelación del hierro y secuestradoras de radicales libres (RL) (Pérez, 2003; Martínez-Flórez et al., 2002) y lo hacen previniendo el inicio de la oxidación o bien rompiendo la cadena (Singh et al., 2014), es decir, finalizan la cadena de formación de especies pro-oxidantes mediante la donación o aceptación tanto de un átomo de hidrógeno como un electrón fundamental (Tenorio et al., 2006). También participan en la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos (Escamilla et al., 2009). La configuración, la sustitución, y el número total de grupos hidroxilo influyen sustancialmente en varios mecanismos de la actividad antioxidante, tales como la captación de radicales y la capacidad de quelación de iones de metal, siendo las agliconas antioxidantes más potentes que sus correspondientes glicósidos (Kumar y Abhay, 2013). Los flavonoides secuestran O<sub>2</sub> y OH siendo la rutina, seguida de la quercetina, el secuestrador más fuerte de O<sub>2</sub>, según Morazzoni y Malandrino. Los flavonoides inhiben también los efectos degradativos provo-

cados por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pérez, 2003). Además, los flavonoides presentes en una mezcla pueden interactuar afectando la capacidad antioxidante total de una solución, tanto de forma sinérgica como antagónica (Hidalgo et al., 2010).

### *Efectos antiateroscleróticos y antitrombóticos*

Cambiando el estilo de vida, incluyendo patrones dietéticos que hacen hincapié en el consumo diario de una variedad de frutas y verduras podemos influir sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular siendo la misma la principal causa de muerte a nivel mundial (Wightman y Heuberger, 2014).

En procesos fisiológicos como la respiración y metabolismo, se producen ROS (especies reactivas de oxígeno) (Khurana et al., 2013), aunque los sistemas de defensa antioxidantes endógenos del cuerpo tienen la capacidad de evitar cualquier efecto dañino (Khalil y Sulaiman, 2010). Sin embargo, en determinadas situaciones (estrés, envejecimiento, etc), aumentan los niveles de ROS, abrumando al sistema antioxidante de la célula, pudiéndose unir los radicales libres y oxidantes altamente reactivos a ADN, lípidos y proteínas para lograr la estabilidad, siendo perjudicial para la salud (Khurana et al., 2013). Así, por ejemplo, en modelos animales de hiperlipidemia (Miller et al., 1998; Mugge et al., 1994), la hipertensión (Morawietz et al., 2001; Zalba et al., 2000; Suzuki et al., 1995), y diabetes (Hink et al., 2001; Sano et al., 1998), los niveles de anión superóxido vascular eran elevados. A nivel cardiovascular, el estrés oxidativo y ROS se ha asociado con el daño endotelial (Khurana et al., 2013), hecho que se conoce en seres humanos, gracias a técnicas no invasivas, como la ecografía, midiendo la vasodilatación de la arteria braquial (Hodgson y Croft, 2006), también se asocia con la progresión de la aterosclerosis y lesiones en el infarto de miocardio. De ahí que los flavonoides, con su alta capacidad antioxidante, pueden reducir el riesgo de muerte por enfermedades del corazón (Sankari et al., 2014; Khurana et al., 2013).

Además de la actividad antioxidante, los flavonoides pueden regular diferentes vías de señalización implicadas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Wallace, 2011), también son catalizadores de metales de quelatos, activando antioxidantes en enzimas, reduciendo los radicales de alfa-tocoferol, e inhibiendo oxidasas (Heim et al., 2002), disminuyen también la actividad de la xantina oxidasa NADPH oxidasa y la lipoxigenasa, enzimas que aumentan la producción de ROS (Kozłowska y Szostak-Wegierek, 2014).

Hay estudios que demuestran la influencia en la salud cardiovascular de dietas ricas en flavonoides, reduciendo el daño post-isquémico miocárdico en ratas (Heim et al., 2002). *Lindera erythrocarpa*, que contiene un número de flavonoides (epicatequina, avicularin y quercitrina) ha demostrado que protege los cardiomiocitos H9c2 contra la muerte celular oxidativa inducida por

el estrés (Kim et al., 2011a). El Estudio de Ancianos Zutphen demostró una relación inversa entre el consumo de catequina, un flavonoide predominante en el té, y la mortalidad por cardiopatía isquémica en una cohorte de 806 hombres (Heim et al., 2002), asociándose la ingesta de flavonoides inversamente con la presión arterial y la mortalidad por cualquier causa (Hodgson y Croft, 2006). El riesgo de enfermedad cardíaca coronaria, consumiendo tres tazas de té al día (rico en catequinas), sería un 10% menor, según los resultados de más de diez estudios prospectivos (Heim et al., 2002). La agregación de plaquetas contribuye a la formación de la aterosclerosis y la formación aguda de trombos de plaquetas. El efecto antiagregante más importante de los flavonoides se considera que es por la inhibición de la formación de tromboxano A<sub>2</sub>. Flavonoides tales como kempferol, quercetina y miricetina demostraron ser inhibidores de éxito de la agregación plaquetaria en monos y perros (Sankari et al., 2014).

### *Efectos hepatoprotectores y sobre el sistema gástrico*

Varios flavonoides tienen efecto hepatoprotector (Jayaraj et al., 2007; Kim et al., 2011b; Liu et al., 2012), tales como catequina, apigenina, quercetina, naringenina, rutina, y venoruton (Kumar y Abhay, 2013). Los polifenoles de uva también, por sus propiedades anti-inflamatorias y antioxidante (Georgiev et al., 2014). La terapia antioxidante inhibe los cambios oxidativos deletéreos y es considerada una herramienta muy importante para los tratamientos de las enfermedades hepáticas (Favari et al., 2013).

Los flavonoides inhiben la motilidad gastrointestinal, la contractilidad y la diarrea (Di Carlo et al., 1993; Gálvez et al., 1995; Gharzouli y Holzer, 2004; Capasso et al., 2008; Borrelli et al., 2012), atenúan el dolor visceral (Gadotti et al., 2005; Shi et al., 2012) e inflamación intestinal (Ocete et al., 1998; Park et al., 2012), y las acciones contra la úlcera gástrica (Di Carlo et al., 1994; Izzo et al., 1994; Suzuki et al., 1998; Borrelli e Izzo et al., 2000; Hariprasath et al., 2012).

Estudios clínicos han demostrado que la hipercolesterolemia y la diabetes en los seres humanos se asocian con un aumento de la generación de anión superóxido vascular (Guzik et al., 2000). Los flavonoides, como antioxidantes, protegen contra los efectos deletéreos de la hiperglucemia y mejoran el metabolismo de la glucosa (Nicolle et al., 2011; Qi et al., 2011; Tang et al., 2011; Zheng et al., 2011).

### *Efectos antibacterianos*

Se han demostrado propiedades como agente antimicrobiano de dos flavonoides aislados de *Z. punctata* (pus-pus) contra bacterias multiresistentes Gram positivas y Gram negativas (Alberto, 2007). Varios flavonoides incluyendo apigenina, galangin, flavona y glucósidos de flavonol, isoflavonas, flavanonas y chalconas han demostrado no sólo que poseen actividad anti-

bacteriana potente sino también que puede ser que tengan múltiples dianas celulares en lugar de un sitio específico de acción (Kumar y Abhay, 2013).

### *Efectos antiosteoporóticos*

En un estudio, la densidad mineral del hueso se comparó entre las mujeres de edad que consumían té y aquellas que no consumen el té y se concluyó que aquellas que lo consumían tenían una mayor densidad mineral ósea que las mujeres que no bebían té. Los flavonoides que están presentes en el té podrían ser responsables de la prevención de la osteoporosis (Sankari et al., 2014).

### *Efectos anti-inflamatorios*

En condiciones fisiológicas normales, la inflamación es una respuesta protectora de los tejidos frente a estímulos nocivos (lesión celular, irritación, invasiones de patógenos) o para eliminar células dañadas y necróticas, siempre que ocurran en un corto período, si la inflamación se prolonga, puede dar lugar a una inflamación crónica (Georgiev et al., 2014). Por este motivo es importante el control de la inflamación, existiendo evidencias del efecto de los flavonoides sobre la inhibición de varias enzimas involucradas en procesos inflamatorios (Wang et al., 1999; Kwon et al., 2005; Garcia-Mediavilla et al., 2007).

El primer estudio que apuntó el potencial efecto beneficioso de los flavonoides en la EII (Enfermedad inflamatoria intestinal) fue realizado por Galsanov y col, describiendo la actividad antiinflamatoria presentada por la quercitrina. Más adelante, otros flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria intestinal, incluyendo heterósidos como la quercitrina, la rutina, la diosmina y la hesperidina, siendo la quercitrina el más potente (Ballester et al., 2006).

La inflamación implica la liberación de ácido araquidónico por la lipoxigenasa y ciclooxigenasa, que son los principales mediadores de la inflamación. Compuestos fenólicos son capaces de inhibir tanto la ciclooxigenasa y las vías 5-lipoxigenasa. La quercetina inhibe ambas vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, retirando así la formación de estos metabolitos inflamatorios (Sankari et al., 2014). Las proantocianidinas en las semillas de uva también tienen una acción antiinflamatoria alta, debido a que eliminan los radicales libres, previenen la peroxidación de lípidos e inhiben la formación de citoquinas pro-inflamatorias (Georgiev, 2014). Estos flavonoides naturales además de ser inhibidores de la COX-2 actúan como antioxidantes contra O<sub>2</sub> y especies radicalarias sin consumirse durante el proceso (quenching físico) permitiendo su

reutilización en consecutivas interacciones con O<sub>2</sub> lo que sumado a la inhibición de la COX contribuirían a mejorar su capacidad antiinflamatoria (Alberto, 2007).

### *Efectos sobre asma y aparato respiratorio*

Los flavonoides pueden tener un efecto beneficioso elevado sobre la rinitis alérgica y asma, según ensayos clínicos recientes (Tanaka y Ryo, 2013). A nivel respiratorio, los flavonoides ejercen efecto antiinflamatorio (Rogerio et al., 2010; Choi et al., 2012; Huang y Liou, 2012) anti-alérgico (Kulka, 2009; Li et al., 2010), antioxidante (Gomes et al., 2012; Li et al., 2012; Yan et al., 2011) y antiespasmódico (Capasso et al., 2009; Macedo et al., 2011). Además, influyen en la defensa contra los microorganismos patógenos modulando la secreción de moco de las vías respiratorias (Kim et al., 2012; Yang et al., 2012).

### *Efectos antitumorales*

Las especies de oxígeno reactivas pueden causar daños al ADN y afectar la división de las células, pudiendo ser insuficientes los sistemas antioxidantes habituales del cuerpo.

El cáncer se puede considerar una enfermedad genética causada por la adquisición secuencial de mutaciones en genes implicados en la proliferación y la muerte celulares, el origen de este proceso se encuentra en el daño producido en el ADN celular causado por procesos endógenos (ataque de radicales libres generados durante el metabolismo, errores en la replicación del ADN, etc) o exógenos (radiación ionizante o ultravioleta, alimentación, carcinógenos químicos, algunos virus y bacterias, entre otros) (Cabrera y March, 2012). Como antioxidantes, los flavonoides pueden inhibir la carcinogénesis. De hecho, estudios han demostrado que el crecimiento invasivo y metastásico de melanoma es inhibido por quercetina y apigenina en ratones (Sankari et al., 2014). No todos los compuestos polifenólicos comparten la misma actividad antiproliferativa; y en función de su estructura, presentan diferencias en la sensibilidad y la selectividad hacia las células tumorales (Sak, 2014).

Las flavonas apigenina, baicaleína, luteolina, nobiletin y tangerina han mostrado ser los flavonoides más eficaces contra los carcinomas de estómago, mientras que la luteolina se ha propuesto como un agente candidato prometedor para el tratamiento del cáncer gástrico. Además de algunos flavonoles, tal como quercetina, fisetina, y galangin, la hesperidina también inhibe las células de cáncer pancreático humano. El crecimiento de células de cáncer de ovario humano no sólo puede ser suprimido por varias flavonas incluyendo apigenina y luteolina sino también por los flavonoles quercetina y kaempferol, careciendo éste último de toxicidad y sien-

do de bajo costo, fácilmente adoptable al estilo de vida de la mayoría de las mujeres (Sak, 2014).

El cáncer de próstata fue significativamente menos frecuente (3,3% vs 30%,  $p < 0,01$ ) respecto a los controles tras un año con suplementación con catequinas del té verde, según Bettuzzi et al (Vance, 2013).

La ingesta de flavonoles y flavonas tiene relación inversa con el riesgo de cáncer de pulmón, según un estudio publicado en 2001, realizado en una cohorte de 27.110 varones fumadores de mediana edad con un seguimiento de más de 6 años. Otro, publicado en 2008, en una cohorte de 34.708 mujeres posmenopáusicas con un seguimiento de 18 años, concluye que hay menos casos de cáncer de pulmón entre las mujeres que consumieron más flavonoides (especialmente flavanonas y proantocianidinas), sobre todo en los subgrupos de fumadoras y ex fumadoras (Cabrera y March, 2012).

### *Efectos antivirales*

Se informó de flavonoides como la quercetina, con signos potentes de habilidades anti-infecciosas y antireplicación. Algunos flavonoides inciden en la replicación intracelular del virus mientras que otros dificultan las propiedades infecciosas de virus (Sankari et al., 2014).

### *Efectos sobre el sistema nervioso*

Los flavonoides son capaces de influir en la actividad del sistema nervioso central dando lugar a efectos ansiolíticos o anti-convulsivos, también como antidepresivos o efecto antiparkinsoniano (Choudhary et al., 2011; Guo et al., 2011; Herrera-Ruiz et al., 2011; Jäger y Saaby., 2011; Jiang et al., 2011; Fernández et al., 2012; Karim et al., 2012; Zhang et al., 2012a, 2012b).

Los flavonoides ejercen efectos neuroprotectores en células y modelos animales atenuando el estrés oxidativo, la excitotoxicidad y la muerte neuronal por apoptosis (Campos-Esparza y Torres-Ramos, 2010; Gutiérrez Merino et al., 2011; Hanrahan et al., 2011; Park et al., 2011; Jones et al., 2012; Xu et al., 2012).

### 1.5.5. Flavonoides cítricos (Naringina, naringenina, hesperidina) y sus efectos en el organismo

Las frutas cítricas como las naranjas, mandarinas (figura 4), pomelos (figura 5) y cítricos ácidos, como son también la bergamota y el limón, son especialmente ricos en contenido de flavonoides y poseen diversas acciones biológicas.



Figura 4. Mandarinas



Figura 5. Pomelos

Actualmente, hay gran interés biomédico en las frutas cítricas porque parecen estar asociadas con la mejora de la supervivencia en los ancianos (Fortes et al., 2000), así como a un menor riesgo de cáncer colorrectal, de esófago (Chen et al., 2002; Levi et al., 2000), gástrico (Palli et al., 2001) y accidente cerebrovascular (Feldman 2001; Joshipura et al., 1999).

En un estudio (Bocco et al., 1998) fueron identificados los compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos de cítricos, obteniendo dos clases principales de compuestos: flavononas y flavonas, siendo las flavononas las más abundantes, y presentes usualmente como digliconas. De éstas se encontraron tres pares de compuestos en su forma glicosilada: la hesperidina, naringina y eriocitrina; y en un segundo grupo de glicósidos o azúcares como la neohesperidina y rutinosa. De las flavonas se presentaron dos grupos, uno formado por flavonas glicosiladas (luteolina, apigenina y diosmina) y otro constituido por flavonas polimetoxiladas (Moreno et al., 2004).

Esos compuestos son de bajo peso molecular y comparten el esqueleto común de difenilpiranos, dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo pirona (Moreno et al., 2004).

La naringina, 7-(2-ramnósido- beta-glucósido) o 4',5,7-trihidroxi-flavanona (Pang et al., 2010) (figura 6), fórmula molecular C<sub>27</sub> H<sub>32</sub> O<sub>14</sub> y un peso molecular de 580,4 g / mol (Alam et al., 2014) es un flavonoide (Yin et al., 2015) en el que dos unidades de ramnosa se adjuntan a su porción aglicona, la naringenina, en la posición 7-carbono (Alam et al., 2014). Debido a que no hay conjugación entre los anillos A y B, la naringina muestra una variedad de actividades biológicas y efectos farmacológicos (Yin et al., 2015).

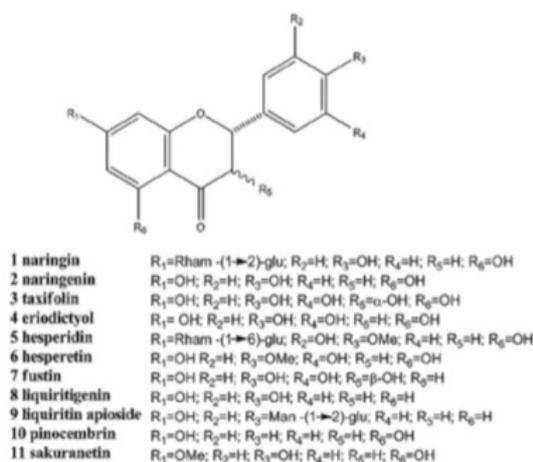


Figura 6. Estructura naringina y comparación con otros flavonoides (Lago, 2014)

La naringina es el principal flavonoide responsable del sabor amargo en los zumos y jugos cítricos, y fue descubierta en 1857 por De Vry en las flores de los árboles de pomelo que crecían en Java (Pang et al., 2010). La concentración de la naringina depende de la madurez de los cítricos, siendo abundante en las frutas inmaduras (Salmah et al., 1990). A medida que el fruto madura, la naringina es hidrolizada por la ramnosidasa a prunina y L-ramnosa. Prunina, que es 33% tan amargo como naringina, a su vez se hidroliza adicionalmente a naringenina y D-glucosa, con una reducción adicional en la amargura (Munish et al., 1996).

La naringina, que es moderadamente soluble en agua (Alam et al., 2014), lleva el grupo ruti-nosa y se hidroliza a su aglicona, naringenina, después de su ingestión oral (Ho et al., 2000) sólo en la parte distal del intestino y el colon por bacterias del colon (Pang et al., 2010) por acción de las enzimas B-glucosidasa y alfa-ramnosidasa (Ho et al., 2000), absorbiéndose luego en el intestino (Alam et al., 2014). La vida media para los conjugados de naringenina en la orina se estimó en 2,6 h. La vida media en plasma de flavanonas era relativamente corto (1-2 h) (Er-lund, 2004). Naringenina se metaboliza rápidamente en el hígado y se convierte en intermedios glucurónidos. Este metabolismo del hígado puede limitar la biodisponibilidad de naringina en plasma in vivo (Alam et al., 2014).

Naringina y **naringenina** se han encontrado en los pomelos y cítricos en altas concentraciones (Jagetia y Reddy, 2002), naranjas amargas (Martearena, 2007) y en uvas (Alam et al.,

2014), siendo la concentración promedio de naringina y naringenina en el zumo de pomelo blanco y rosa de 1.000 ppm superando la naringina a la naringenina en una proporción 9:1 (LLuch et al., 2009; Rojas et al., 2007). La concentración de estos flavonoides es más alta en la fruta inmadura que en la madura y están presentes principalmente en las cáscaras. Su obtención como subproductos es de interés como vía para diversificar la industria procesadora de cítricos (Vincent, 1962; Braddock, 1995). La naringina se usa en perfumería y para dar sabor a golosinas, bebidas y productos de panadería (Giannuzzo et al., 2000).

Existen numerosos estudios que pretenden mejorar el rendimiento en las extracciones de los polifenoles. De este modo, (Giannuzzo et al., 2003) utilizaron dióxido de carbono supercrítico modificado con 15% de etanol y fresco (en lugar de secado) sobre las cáscaras a 95 bar y 58,6 °C, obteniendo un rendimiento de naringina y naringenina más alto (14,4 g / kg) que el alcanzado por la técnica convencional de maceración, y cercanos a los obtenidos por métodos de reflujo y Soxhlet; además, el tiempo de la extracción fue menor (Giannuzzo et al., 2003). En seres humanos, la biodisponibilidad de la hesperidina puede ser mejorada por la eliminación del grupo ramnosa para producir hesperetina-7-glucósido (H-7-GLC) (Habauzit et al., 2009).

Ejemplo concentraciones naringina en jugo (Alam et al., 2014) (tabla 5).

	Naringin content
	$\mu\text{g/mL}$
<i>Citrus (C.) sinensis</i>	21.3
<i>C. aurantium</i>	19.7
<i>C. reticulata</i>	3383.6
<i>C. clementina</i>	8.0
<i>C. bergamia</i>	22.3
<i>C. paradisi</i>	230.0
Phenol Explorer database	
Pure juice (naringenin)	15.6
Fruit juices/citrus juices (naringin)	
Orange (blond), pure juice	7.0
Grapefruit, juice from concentrate	37.8
Pummelo, pure juice	84.8
Grapefruit, pure juice	30.8
Grapefruit/pummelo hybrid, pure juice	45.1
USDA polyphenol database	
Grapefruit, raw (color not specified) <i>C. paradise</i> (naringenin)	53.0
Grapefruit, raw, pink and red, all areas ( <i>C. paradisi</i> ) (naringenin)	32.6
Grapefruit, raw, white, all areas ( <i>C. paradisi</i> ) (naringenin)	21.3
Grapefruit juice, white, raw (naringenin)	18.2
Grapefruit juice, white, canned, unsweetened (naringenin)	18.0
Grapefruit juice concentrate, white, frozen, unsweetened, diluted with 3 volumes of water (naringenin)	31.2

Tabla 5. Ejemplo concentraciones naringina naringina (Alam et al., 2014)

La **hesperidina** y **neohesperidina** son los principales metabolitos secundarios de las naranjas y limones (LLuch et al., 2009).

La estructura de la hesperidina corresponde a hesperetina (4'-metoxi-3',5,7-trihidroxi-flavonona), vinculado a rutinosa (compuesto por una molécula de ramnosa y uno de la glucosa) en la posición C7 (Horcajada et al., 2008). La hesperidina o (5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglucósido), abundante en naranja dulce y limón (Abdel y Abdel, 2009), se ha aislado de la naranja ordinaria *Citrus aurantium* y otras especies del género *Citrus* (familia: Rutaceae) (Agrawal et al., 2014) aunque también se ha reportado que se encuentra en muchas plantas distintas de la fruta cítrica, tales como en los géneros Fabaceae, Betulaceae, Lamiaceae y Papilionaceae (Majumdar y Ramesh, 2009). Además, es un barato subproducto cítrico (Abdel y Abdel, 2009). El zumo de naranja, por ejemplo, contiene entre 200 y 600 mg de hesperidina/L (Tomás-Barberán y Clifford, 2000), representando el 90% de las flavanonas totales en él (Morand et al., 2011). La concentración media de hesperidina era 246,69 / 201,3 µg / ml (intervalo 53,8 / 735,3 µg / ml), 166,79 / 79,7 µg / ml (intervalo 45,9 / 237,7 µg / ml) y 30,69 / 15,7 µg / ml (intervalo 15,9 / 47,2 µg / ml) para las muestras de naranja, mandarina y jugo de limón, respectivamente (Kanaze et al., 2003). Todas las frutas cítricas de tipo naranja contienen hesperetina y naringenina, agliconas flavanonas, pero rara vez se producen agliconas libres en la propia fruta. Los glucósidos flavanona dominantes en las naranjas dulces (*C. sinensis*) son la hesperidina y naringin, mientras que en las naranjas agrias (*C. aurantium*) los dos glucósidos flavanona predominantes son neohesperidina y naringina. La principal diferencia entre los glucósidos flavanona de naranjas dulces y agrias está en sus restos de azúcar, que influyen en el sabor (Julia et al., 2006).

De la hidrólisis de los glicósidos hesperidina y naringina se obtiene, por un lado la ramnosa y por otro, el glucósido, de la hesperetina y prunina respectivamente, que tienen potenciales aplicaciones (Martearena, 2007).

La hesperetina se absorbe en el colon después de la liberación de la fracción rutinosa de hesperidina por la microflora intestinal (Horcajada et al., 2008) pero la recuperación urinaria acumulada indica baja biodisponibilidad (<25%) debido, a entre otros factores, la pobre solubilidad en agua y precipitación en un ambiente ácido, según Ameer et al (Majumdar y Ramesh, 2009).

## **Acciones de los flavonoides cítricos**

Los flavonoides cítricos abarcan un enorme espectro de acciones en el organismo, aquí enumeramos algunas. Las acciones anticáncer incluyen el bloqueo, supresión y la transformación de los agentes. Efectos en el sistema cardiovascular, antitrombóticos, antiisquémico, antioxidante, y vasodilatador. Se ha sugerido que los flavonoides disminuyen el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria en las tres principales acciones: la mejora de la vasodilatación coronaria, la disminución de la capacidad de las plaquetas en la sangre durante la coagulación y la prevención de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Benavente-García y Castillo, 2008; LLuch et al., 2009).

Las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides cítricos también se han estudiado y son debidas a la inhibición de la síntesis y actividad biológica de los diferentes mediadores proinflamatorios, principalmente los derivados del ácido araquidónico, prostaglandinas E 2, F 2, y el tromboxano A 2 (Benavente-García y Castillo, 2008; LLuch et al., 2009).

El papel antioxidante de los cítricos flavonoides pueden desempeñar un papel clave en su actividad contra varias enfermedades degenerativas y en particular las enfermedades cerebrales (Benavente-García y Castillo, 2008).

## **Acciones generales de la naringina**

Naringina ejerce efectos anti-cancerígenos, anti-tumorales, hipocolesterolémicos, además de ser una de las razones de la actividad antioxidante total de los cítricos, también tiene efecto cardioprotector (Rani et al., 2013), anti-inflamatorio e hipolipidémico (Chanet et al., 2012). Recientemente, Gopinath y Sudhandiran (2012) han informado de que la naringina posee efecto neuroprotector contra los trastornos neurodegenerativos a través de la modulación del estrés oxidativo y respuesta inflamatoria (Jung y Sang, 2014) y se ha demostrado su capacidad para evitar la neurodegeneración (Leem et al., 2014).

Estudios para aplicar la naringina en diversas situaciones se han reportado en diferentes condiciones:

Para curar, de manera tópica, la úlcera del pie diabético, tras inducir una herida en la superficie dorsal de la pata trasera de ratas. Se observó mejora en aquellas tratadas con naringina que en las que no (Kandhare et al., 2014). Igualmente mejoró el índice de la úlcera intragástrica provocada por ácido acetilsalicílico en ratas con una administración de naringina a razón de 200 mg/kg (Galati et al., 1998).

Se observa mejoría significativa en grupos de ratas Wistar macho tratados con naringina (40 y 80 mg / kg) en la función ventricular izquierda en 15, 30 y 45 min después de la eliminación de la abrazadera respecto al grupo control (Visnagri et al., 2015) así como efecto cardioprotector en ratas tras lesión miocárdica provodada al 15º día en los grupos que tomaban naringina (20-80 mg / kg / día, por vía oral) respecto al grupo que ingería solución salina (Rani et al., 2013), así como mejora de la estructura, función del corazón y un descenso de concentraciones de lípidos en plasma tras alimentar las ratas con dietas ricas en grasa en aquellas alimentadas con naringina (Alam et al., 2013). El grado de agregación plaquetaria se redujo significativamente por la naringina en ciertas dosis en comparación con los de los conejos del grupo de modelo tras ser alimentados con una dieta alta en grasa / colesterol durante cuatro semanas (Xiao et al., 2014). En este estudio in vivo, los resultados mostraron que una cierta concentración (1-100  $\mu$  g/ml) de la naringina puede aumentar la proliferación y diferenciación os-

teogénica de CMMO. Sin embargo, el número de células en el grupo de 200  $\mu$ g / ml naringina disminuyó rápidamente, lo que indica que una concentración superior fue seriamente tóxica para el crecimiento celular (Yin et al., 2015).

De estos componentes se pueden obtener derivados, como muestra este estudio, que indica que es posible obtener derivados de naringina con actividad antimicrobiana importante, especialmente contra las bacterias patógenas Gram-positivas (Céliz et al., 2011).

## **Acciones generales de la naringenina**

La naringenina presenta actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, antiviral contra el virus de herpes simple tipo 1 (HSV), virus parainfluenza tipo 3. También regula la función del sistema inmune en un modelo de infección de cáncer de pulmón, donde se reduce IL-4, pero aumentó IL-2 y niveles de IFN- $\gamma$ . En otro estudio, Shi et al. también demostraron que la naringenina posee un papel inhibitorio en la inflamación de las vías respiratorias inducida por alérgenos (Yilma, 2013).

Naringenina mejora trastornos metabólicos in vitro pero también in vivo, concretamente en hembras de ratones ovariectomizadas tras una dieta hipercalórica (11 semanas). Aquellas que fueron alimentadas con naringenina mostraron niveles de glucosa e insulina en ayunas menor en comparación con el grupo control, con la reducción de más del 50% de la adiposidad intra-abdominal y subcutánea (Ke et al., 2015).

Fallahi et al, (2012), observaron una mejora de la integridad del endotelio y reactividad aórtica en ratas diabéticas macho tratadas con naringenina respecto al grupo control (Fallahi, 2012).

## **Acciones generales de la hesperidina**

La hesperidina tiene efectos vasoprotectores, ya que mejora el estado de los capilares aumentando su resistencia y reduciendo su permeabilidad (Horcajada et al., 2008).

Además de reducir los niveles de colesterol, se le atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas (Londoño y Sierra, 2007), así como efecto protector contra la sepsis en los animales (Abdel y Abdel, 2009), es antialérgico y radioprotector y actúa contra el estrés oxidativo en el hígado y riñón de los conejos diabéticos (Agrawal et al., 2014).

Hesperidina puede disminuir la agregación plaquetaria, que se cree que es beneficioso en los casos de la permeabilidad capilar y la fragilidad, para tratamiento de la retinopatía diabética o la degeneración macular (Majumdar y Ramesh, 2009).

En ratas diabéticas, aquellas tratadas con hesperidina (100 mg / kg) y tras realizársele oclusión de la arteria coronaria durante 45 minutos y reperfusión 1 hora se observó una mejora de la presión arterial media y reducción de la presión diastólica final ventricular izquierda, respecto al grupo control, ejerciendo un efecto cardioprotector (Agrawal et al., 2014).

El efecto radioprotector de hesperidina frente a la genotoxicidad debido a la irradiación gamma de forma inducida se ha investigado in vivo / in vitro en cultivos de linfocitos de sangre de voluntarios humanos. Los resultados mostraron un aumento significativo en la incidencia de micronúcleos después de la exposición de las células a irradiación gamma en comparación con las muestras de control. Se observó la máxima protección y la disminución de la frecuencia de micronúcleos (33%) 1 h después de la ingestión de hesperidina (Hosseinimehr et al., 2009).

### **1.5.6 Acciones específicas sobre el hueso de la naringina y naringenina**

#### **Naringina y hueso**

##### **In vitro**

Este estudio consistió en explorar el potencial de la osteogénesis de las células humanas periodontales madre ligamento (hPDLSCs) inducidas por naringina in vitro e in vitro. Los resultados confirmaron que naringina 1  $\mu$ M realizaba el mejor efecto y una colección de genes relacionados con los huesos (RUNX2, COL1A2, OPN, y OCN) tenía niveles de expresión significativamente más altos en comparación con el grupo control. Además, se observó una estructura trabecular típica in vivo, rodeada por una gran cantidad de osteoblastos. Estos resultados demostraron que la naringina, a una concentración de 1  $\mu$ M, pueden promover eficazmente la proliferación y diferenciación de hPDLSCs tanto in vitro como in vivo (Yin et al., 2015).

En este estudio se determinó que la naringina puede inhibir eficazmente la osteoclastogénesis y suprimir la osteólisis tanto in vitro (osteoclastos generados a partir de monocitos de médula ósea de ratón) como in vivo (ratón) (Yu et al., 2013).

Wong y Rabie estudiaron los efectos de la naringina sobre las actividades de las células óseas. Se establecieron dos grupos, el grupo control consistió en células cultivadas sin ningún tipo de intervención mientras que el grupo experimental (naringina) estaba formado por células en cultivo con diferentes concentraciones de naringina (0,001 micromoles / L, 0,01 micromoles / L, y 0,1 micromol/L), ambos grupos se estudiaron con diferentes intervalos de tiempo (24 h, 48 h, h y 72 h). Se cuantificó el contenido total de proteínas y actividad de la fosfatasa alcalina, para medir las actividades celulares. La naringina en una concentración elevada (0,1 micromoles) incrementó significativamente la actividad hasta un 20% de la fosfatasa alcalina. Se obser-

va que los efectos de la naringina sobre la célula ósea in vitro es dosis dependiente, a mayor concentración de naringina, mayor efecto sobre las células óseas (Wong y Rabie, 2006a).

Las altas dosis de la naringina, al contrario que sucedía con las bajas dosis de este componente, podría promover la proliferación y diferenciación de las células MC3T3-E1 (células para sintetizar osteocalcina) tanto a las 12 horas como a las 24 h horas y con una baja citotoxicidad (Ding et al., 2009).

Zhang et al., (2009) describieron el efecto de la *Drynariae Rhizoma* (cuyo componente principal es la naringina) sobre las células madre mesenquimales del hueso (BMSCs). Los BMSCs humanos fueron cultivados con diferentes concentraciones de solución de naringina. A continuación, se analizaron los marcadores de diferenciación osteogénica y la capacidad de proliferación. Los resultados indicaron que una concentración (100-100 microg/ml) de la solución de naringina estimula la proliferación y la diferenciación osteogénica de BMSCs humanos (Zhang et al., 2009).

Las Proteínas Morfogénicas Oseas (BMP) juegan un papel importante en la diferenciación osteoblástica y la formación de hueso, en consecuencia, los componentes implicados en la activación de BMP son buenos objetivos para el desarrollo de fármacos anti-osteoporosis. Se comprobó que la naringina mejoraba la actividad de la fosfatasa alcalina, nivel de osteocalcina, osteopontina y la síntesis de la proliferación celular en cultivos de osteoblastos primarios; concretamente aumentó los niveles de ARNm y las proteínas BMP-2 (Wu, 2008).

## **Naringenina y hueso**

### **In vitro**

*Drynaria fortunei* (Kunze) es una hierba china tradicional que se usa para el tratamiento de la osteoporosis y otros trastornos metabólicos relacionados con los huesos. Se identificaron cinco agliconas flavonoides, entre las cuales estaba presente la naringenina. Tras el estudio se concluyó que estos flavonoides podrían promover la diferenciación y la mineralización de los osteoblastos UMR 106 (células osteoblásticas) in vitro. Este estudio proporciona evidencias para el apoyo científico en la realización de experimentos in vivo para confirmar los posibles efectos de agliconas flavonoides en la prevención de la osteoporosis inducida por ovariectomización de ratones (Wang et al., 2011).

El propósito de este estudio (La et al., 2009) fue investigar el efecto de la naringenina en la osteoclastogénesis en humanos. También se estudió la reabsorción ósea osteoclástica. La naringenina (a concentraciones de 10, 25 y 50 microg / ml) inhibió significativamente la osteoclastogénesis (por 29+/-5, 57+/-8 y 96+/-1%, respectivamente), también disminuyó significati-

vamente la liberación de péptidos helicoidales 620-633, un indicador de la actividad de reabsorción ósea (un 44+/-0.5, 73+/-0.5 y 86+/-1%, respectivamente). Disminuyeron los valores de secreción de Interleuquina (IL)-1 alfa (un 59%), IL-23 (un 87%) . Como dato a destacar, se vió que la naringenina no era más tóxica a la concentración más alta utilizada (50 microg/ml). Por lo tanto, es una promesa como agente terapéutico o preventivo para las enfermedades relacionadas con los huesos como la periodontitis (La et al., 2009).



## **II. Hipótesis de trabajo y objetivos**



## **2.1- Hipótesis de trabajo**

Existen sustancias naturales que pueden influir de forma positiva en la formación de tejido óseo tras una injuria. Hemos realizado una revisión de la literatura científica al respecto y hemos decidido estudiar el efecto de la aplicación de naringina con y sin extracto de uva y en combinación con el colágeno.

## **2.2.-Objetivos**

1. Estudiar los cambios densitométricos que se producen durante la curación de defectos óseos creados en tibia, maxilar y mandíbula de conejos albinos de Nueva Zelanda, mediante densitometría.
2. Estudiar el efecto del relleno de dichos defectos con naringina, sola y en combinación con extracto de uva y/o colágeno.
3. Determinar la correlación anatómica en términos de densidad, en tibia, maxilar y mandíbula, mediante el estudio con micro-tomografía computarizada (micro-TC).



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 3.1 Materiales

### 3.1.1 Animales

Los animales de experimentación utilizados en este trabajo de investigación o reactivos biológicos para el investigador (Hernández, 2006), corresponden a 7 conejos albinos Nueva Zelanda (*Oryctolagus Cuniculi*), siendo la clase: mamífero, orden: lagomorpha, género: leporidae y *oryctolagus* y especie: *cuniculus* (Fuentes et al., 2010). Los conejos de Nueva Zelanda se caracterizan por tener el cuerpo cilíndrico y ser de temperamento ligeramente nervioso. Estos animales están estandarizados, lo que significa que tienen una composición genético-sanitaria definida y, además, fueron criados y mantenidos en ambientes controlados (Hernández, 2006) siguiendo la guía establecida por la Unión Europea sobre la protección de los animales utilizados en experimentación (86/609/CEE).

Los animales presentaban un peso medio de  $3665 \pm 127$  gr, teniendo por tanto, buena capacidad para soportar el trauma quirúrgico (Mapara et al., 2012) y entre 15-18 semanas de edad (edades próximas al cierre fisario cuando alcanzan el volumen óseo adecuado para el estudio), siendo de ambos sexos, ya que no se han descrito diferencias entre sexos respecto al metabolismo óseo.

Los animales fueron suministrados por el Servicio de Animales de laboratorio (SAI, nº RE-GAES: 300305440012) de la Universidad de Murcia. La parte experimental se realizó en el quirófano experimental del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia.

Los animales fueron tratados siguiendo las normas del Real Decreto 1201/2005 del 10 de octubre, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y la Ley 32/2007 de 7 de Noviembre para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

### 3.1.2 Agentes

Los biomateriales seleccionados en este estudio previamente han despertado nuestro interés gracias a referencias bibliográficas en el que ha quedado patente su eficacia experimental en animales en el campo de la regeneración ósea, así como en ensayos clínicos.

En este estudio utilizamos el flavonoide **naringina**, gracias al interés biomédico suscitado por este producto, proporcionado por la empresa Nutrafur S:A (Alcantarilla, Murcia). La naringina o

7-(2-ramnósido-beta-glucósido) es un flavonoide en el que dos unidades de ramnosa se unen a su porción aglicona, la naringenina, en la posición C7.

La naringina aquí utilizada fue obtenida del pomelo, representando un 53,21% del total de flavonoides del extracto (un total de 69,26%).

También hemos utilizado **extracto de semilla de uva**, que tiene un 90,9% de polímeros procianidinas.

Para este estudio hemos utilizado las siguientes combinaciones:

Naringina sola, naringina combinado con extracto de semilla de uva y naringina en combinación con colágeno de origen porcino. En el caso de las combinaciones, las proporciones de cada compuesto eran 50/50%. Para determinar la masa exacta en esta etapa utilizamos una balanza analítica, que se caracteriza por su precisión, exactitud y sensibilidad.

**Anestésico.** Clorhidrato de Ketamina (“Imalgene 1000”, Merial(registrado). Laboratorios Merial. Francia) Xilacina; (“Xilagesic” al 2%. Laboratorios Calier, S.A. Barcelona. España), 1 ml/kg.

**Analgésico.** Hidrocloruro de buprenorfina 0,3 mg/ml (Divasa-Farmavic S.A. Barcelona. España).

**Antibiótico.** Erofloxacina 25 mg; (“ALSIR” 2,5%, Veterinaria-Esteve. Barcelona. España).

**Eutanásico.** Pentobarbital sódico (Dolethal(registrado); Lab. Vetoquinol. Cédex. Francia).

### 3.1.3 Aparatos

Para el desarrollo del estudio se utilizaron los siguientes equipos:

Equipo de micro-TC: Microtomógrafo de rayos X de sobremesa, escáner multimodal SPECT/CT Albira II ARS perteneciente a la Universidad de Murcia (figura 7).

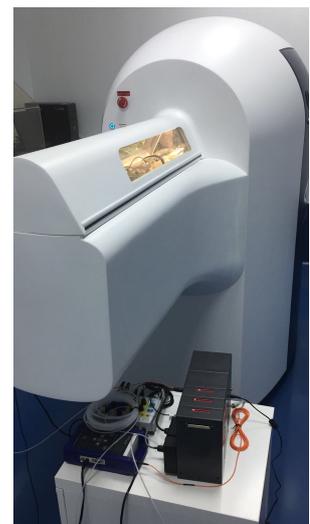


Figura 7. Escáner multimodal SPECT/CT

## 3.2 Métodos, procedimiento experimental estudio “in vivo”

### 3.2.1 Planificación del procedimiento

Los experimentos fueron aprobados por el comité ético local y se aseguró que los procedimientos respetaran la normativa de la UE (BOE 223/1988 y 265/1990) para la manipulación de animales de experimentación.

A los animales se les aplicó el material objeto de estudio (naringina sola o combinada) tanto en las patas traseras como en el maxilar y mandíbula. Se usaron 13 patas traseras correspondientes a 7 conejos (tanto derecha como izquierda, una se desechó por malformación), realizando 2 perforaciones por pata, dando lugar a 26 perforaciones en las patas, 7 porciones del maxilar y 7 de la mandíbula.

Lugares y distribución de la inserción de los materiales estudio del proyecto:

En el caso de la tibia, se realizaban dos defectos con trefina (uno superior y otro inferior) en cada pata trasera de los animales. Posteriormente se rellenaban con el tratamiento correspondiente o no se aplicaba ningún tratamiento en el caso de los defectos de control.

Maxilar superior: Extracción incisivo superior derecho y relleno del defecto con naringina y colágeno.

Mandíbula: Extracción incisivo inferior derecho y relleno del defecto con naringina y extracto de uva.

El diseño del estudio quedó de la siguiente manera (tabla 6):

7 defectos control (tibia)

7 defectos con naringina (tibia)

6 defectos con naringina y colágeno (tibia) (la pata del conejo 7 se descartó, por malformación)

6 defectos naringina y extracto uva (tibia, porque la pata del conejo 7 se descartó, por malformación)

7 defectos con naringina y colágeno (maxilar superior)

7 defectos con naringina y extracto de uva (mandíbula)

Los conejos se sacrificaron a los 6 meses después del día de la cirugía.

Todos los conejos sobrevivieron hasta la eutanasia, sólo se descartó la tibia izquierda del conejo 5353 por malformación previa y no por complicaciones en la cirugía.

Conejos								
5154	Tibia derecha	Superior	Control	Tibia izquierda	Superior	Naringina+Extracto uva	Maxilar superior	Naringina+Colágeno
		Inferior	Naringina		Inferior	Naringina+Extracto uva	Mandibula	Naringina+Extracto uva
5153	Tibia derecha	Superior	Control	Tibia izquierda	Superior	Naringina+Colágeno	Maxilar superior	Naringina+Colágeno
		Inferior	Naringina		Inferior	Naringina+Colágeno	Mandibula	Naringina+Extracto uva
5206	Tibia derecha	Superior	Naringina	Tibia izquierda	Superior	Naringina+Extracto uva	Maxilar superior	Naringina+Colágeno
		Inferior	Control		Inferior	Naringina+Colágeno	Mandibula	Naringina+Extracto uva
5356	Tibia derecha	Superior	Control	Tibia izquierda	Superior	Naringina+Colágeno	Maxilar superior	Naringina+Colágeno
		Inferior	Naringina		Inferior	Naringina+Extracto uva	Mandibula	Naringina+Extracto uva
5355	Tibia derecha	Superior	Control	Tibia izquierda	Superior	Naringina+Extracto uva	Maxilar superior	Naringina+Colágeno
		Inferior	Naringina		Inferior	Naringina+Colágeno	Mandibula	Naringina+Extracto uva
5352	Tibia derecha	Superior	Control	Tibia izquierda	Superior	Naringina+Colágeno	Maxilar superior	Naringina+Colágeno
		Inferior	Naringina		Inferior	Naringina+Extracto uva	Mandibula	Naringina+Extracto uva
5353	Tibia derecha	Superior	Naringina	Tibia izquierda	X	X	Maxilar superior	Naringina+Colágeno
		Inferior	Control		X	X	Mandibula	Naringina+Extracto uva

Tabla 6. Distribución conejos y lugares inserción biomaterial

Tras el sacrificio y, antes de proceder la micro-tomografía computarizada (micro-TC) se obtuvo la porción de la tibia que abarca ambos orificios más un margen tejido óseo periférico (aproximadamente 2/3 proximales de la tibia), así como la mandíbula y el maxilar superior.

### 3.2.2 Protocolo quirúrgico

#### 3.2.2.A. Examen, registro y documentación de datos

Los conejos recién llegados al animalario fueron examinados para detectar las enfermedades más comunes como son la pasteurelosis, mixomatosis, enteritis, enterotoxemia, salmonelosis, colibacilosis, estreñimiento, mastitis, dermatitis y (Fuentes et al., 2010) sarna (siendo ésta altamente contagiosa y es capaz de dañar las vías respiratorias, predisponiendo a la neumonía).

Posteriormente y, ante la ausencia de incidencias en la exploración, se pusieron en cuarentena por un mínimo de dos semanas, sirviendo este periodo también de adaptación al entorno y la rutina diaria en los cuartos de animales (Mapara et al., 2012). Los conejos se mantuvieron en jaulas de malla individuales (0,90 × 0,60 × 0,45 m) en el Servicio de Animales de Laboratorio del SAI de la Universidad de Murcia. Es bien conocido que el estado sanitario de los animales interfiere en el resultado de las investigaciones y está ligado a la capacidad de respuesta (Hernández, 2006).

En una hoja de protocolo individualizada anotamos todos los datos de cada animal, así como la experiencia e incidencias si las hubieran. En el libro de registro quedó patente el nombre del

investigador y número de jaula, realizando perforación en la oreja al conejo con un tatuador Dermotron, para su identificación numérica.

### **3.2.2.B Cuidados y datos de interés prequirúrgicos**

#### Temperatura y humedad

Se les mantuvo a temperatura de 20-21° C, humedad relativa del aire 45-65%, esto es muy importante ya que una reducción en la temperatura ambiente por debajo de la capacidad de un animal para regular la temperatura corporal aumenta su susceptibilidad a las infecciones (Damy et al., 2010) y, por el contrario, la exposición a altas temperaturas puede causar, en conejos, el lamido del pelo (Navarro et al., 2012). Para evitar un aumento de concentración de amoníaco en el aire (Mapara et al., 2012) para respirar, conduciendo a irritación del epitelio de las vías respiratorias superiores y elevando la susceptibilidad del conejo de padecer enfermedades infecciosas, se aseguró una adecuada ventilación y una buena higiene, renovando el aire 15 veces/hora a una velocidad máxima del aire 0,5 m/s.

#### Iluminación

La intensidad de la luz se mantuvo en una franja entre 300 a 450 lux a 1 metro por encima del suelo y 600 lux a 1 m del techo, justo debajo de la fuente de luz, evitando la luz directa. Los ciclos de luz/oscuridad fueron en una serie 12/12. La fuente de luz fue fluorescente en lugar de incandescentes (Damy et al., 2010), el ruido máximo fue de 55 dB.

#### Hidratación y nutrición

Respecto a la hidratación y nutrición, aparte de su disponibilidad durante todo el día, el agua, que fue clara y potabilizada, se cambió cada día para evitar el acúmulo de algas (Fuentes et al., 2010). Se exploró la piel, elevando la parte posterior del cuello del conejo hacia arriba, estirando lo suficiente para que sea cómodo para el conejo, el encaje rápido de la piel denotó una buena hidratación, en caso de tardanza se habría requerido atención inmediata (Mapara et al., 2012). Se los alimentó con una dieta completa de mantenimiento (Pienso 112 U.A.P, PANLAB) y durante el periodo de adaptación, los animales bebieron y comieron “ad libitum”.

#### Manipulación

Nunca se manipuló un conejo cogiéndolo por las orejas, por la alta probabilidad de causar luxación cervical y la muerte. Se hizo agarrando un gran pliegue de piel suelta sobre los hombros con una mano y, con la otra mano, asegurándonos que apoyen los pies o sostener su trasero

(Mapara et al., 2012). Para trayectos largos se utilizaron jaulas, cestos o cajas (Fuentes et al., 2010).

### **3.2.2.C Premedicación y anestesia**

#### **Método anestésico**

Con el método anestésico buscamos cumplir serie de principios farmacológicos, consiguiendo una mínima toxicidad hepática y renal, fácil eliminación, alto margen de seguridad y mínimos efectos secundarios.

#### **Profilaxis antibiótica**

Amoxicilina (Clamoxyl LA, laboratorios Pfizer), administrando una dosis de 0,1 ml/k, vía im, administrada en monodosis y 30 minutos antes de la intervención.

#### **Premedicacion**

Con efecto sedante a los 10-15 minutos de la administración. Sulfato de atropina (0,3 mg/k, vía im.): el objetivo es reducir la secreción excesiva de las vías respiratorias altas, la motilidad intestinal, así como la bradicardia producida por ciertos agentes anestésicos.

Hidrocloruro de clorpromacina (10 mg/k, vía im.): con ello reducimos las dosis de agentes anestésicos, sobre todo de los barbitúricos. A los 10-15 minutos conseguimos el efecto sedante, reduciendo la ansiedad del animal y proporcionando una buena relajación muscular.

#### **Inducción anestésica**

Clorhidrato de ketamina (Merial) (50 mg/k, vía im). Hipnótico de acción rápida y potente analgésico de escasa acción como relajante muscular, que se potencia con la clorpromacina. No causa depresión respiratoria ni tiene efectos acumulativos, consiguiendo una acción analgésica suficiente para la cirugía a los 15-20 minutos. La pauta de mantenimiento es a demanda mediante la administración de 20 mg/k, vía im ante el menor signo de agitación del animal.

Atropina al 1%: si bien se usa como anestésico local en odontología, en este estudio se ha utilizado como anestésico local tanto en las tibias como en los maxilares, no solo por su efecto anestésico sino por su gran grado de vasoconstricción para reducir en mayor grado el sangrado en la zona intervenida y favorecer así la visión del campo quirúrgico.

La profundidad de la anestesia se evalúa la respuesta a oreja-pinch y reflejos palpebrales y córnea.

### **Afeitado y antisepsia**

Tras la premedicación del animal, afeitamos la zona, con una máquina de afeitar eléctrica, se rasuró ambas patas traseras en una zona comprendida entre el 1/3 medio del muslo y el 1/3 medio de la pata. Todos los pelos afeitados se limpiaron de inmediato para evitar la contaminación como aconseja (Mapara et al., 2012). Seguidamente, para la asepsia del campo quirúrgico, se aplicó en la zona polividona yodada al 10% (Betadine). A continuación aislamos dicha zona, dejando expuesta únicamente el área de la rodilla y de la región maxilar y/o mandibular, mediante un paño fenestrado estéril, aquí aplicamos un campo estéril del tipo Steri-Drape de 10 x 10 cm.

El rasurado no se realizó en la región maxilar y mandibular al ser la intervención en medio intrabucal, pero sí se realizó una asepsia de la zona aplicando polividona yodada.

### **Procedimiento quirúrgico**

Las intervenciones se realizaron en un quirófano de cirugía experimental convencional de 20 m<sup>2</sup> separado convenientemente de las aéreas de rasurado, almacén de material quirúrgico, área de recuperación y vigilancia postoperatoria, según las recomendaciones de Alexander (1974) y normativa actual, bajo rigurosas normas de asepsia.

Tras el afeitado y asepsia del campo quirúrgico (Figura 8 y 9) procedimos a realizar la técnica quirúrgica que la vamos a dividir en dos fases: una fase desarrollada en las tibias de los conejos tratados y otra desarrollada en la cavidad bucal.

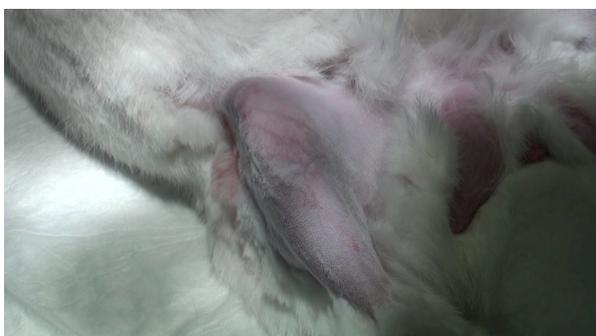


Figura 8. Afeitado del campo quirúrgico



Figura 9. Asepsia del campo quirúrgico

## Tibia conejos

Se realizó una incisión cutánea, en el lado ventral de la articulación, utilizando un No. 22 de la hoja de bisturí montado en un mango de bisturí, de unos 15 mm teniendo los relieves óseos proximal y distal de la tuberosidad tibial como referencias anatómicas (Figura 10).

La incisión se realizó hasta el hueso, separando el periostio con un periostotómo de Freer, exponiendo el hueso a tratar (Figura 11). Esta vía de abordaje es poco traumática y sangrante evitando hemorragias profundas y descensos importantes de la volemia.



Figura 10. Incisión cutánea



Figura 11. Exposición del hueso

Marcamos con una punta de gratifo la zona donde se practicarán los lechos de las trefinas, asegurándonos que estén separados ambas líneas circulares por un espacio de, al menos 5 mm, para evitar la contaminación del producto objeto de estudio. Con fresas trefinas de 4 mm de diámetro montadas en un micromotor a bajas revoluciones e irrigación con suero fisiológico, perforamos la cortical en todo su espesor hasta la médula ósea (Figura 12), realizando dos defectos por tibia (Figura 13), lavando posteriormente las perforaciones con Ringer Lactato para arrastrar todas las partículas óseas resultantes del fresado óseo. A continuación, se ponen los productos objeto de estudio.



Figura 12. Perforación de la cortical



Figura 13. Segundo lecho ya preparado

Tras el depósito del material objeto de estudio (Figura 14) o no, si es un defecto control, se procedió al cierre de la herida de manera cuidadosa. Comenzamos por el periostio y el plano muscular profundo con puntos sueltos de Coated Vicryl® 4/0, de esta manera, contribuimos a la estabilidad del implante en el lecho receptor evitando su extrusión, así como la formación de hematoma importante. A continuación, suturamos el plano cutáneo gracias a una sutura continua y puntos simples con Vicryl rapide® 3/0 (Figura 15).

Finalmente, se realizó el lavado de la herida quirúrgica con suero fisiológico, se volvió a aplicar el antiséptico povidona yodada y se aplica un apósito plástico en spray del tipo Nobecutan®.



Figura 14. Depósito naringina



Figura 15. Sutura

### **Cavidad bucal conejos**

Al igual que en el ser humano, la cavidad bucal del conejo de Nueva Zelanda tiene dos porciones diferenciadas: el vestíbulo de la boca y la cavidad bucal propiamente dicha (Vazquez-Auton, 1999).

Los conejos no presentan caninos, estando los incisivos separados de los premolares por un espacio denominado diastema. Los incisivos principales tienen un borde cortante y crecen durante toda la vida (Fuentes et al., 2010).

Para el estudio tanto en maxilar como en mandíbula optamos por realizar extracciones de un incisivo central (Figura 16), tanto superior como inferior, siempre homolaterales, asociados a una extirpación de la cortical vestibular, creando así grandes defectos.



Figura 16. Extracción incisivo central superior

Para esta parte, se le realizó una incisión con bisturí y hoja del n° 15C, intraoralmente hasta el periostio, a continuación, se procede a desperiostizar desde la línea media interincisal continuando crestalmente hasta el 1/3 medio del paladar.

Entonces procedimos a la extracción del incisivo central maxilar y/o mandibular, y a continuación se extirpó la tabla vestibular adyacente para así crear un gran defecto. Estos defectos fueron rellenados con naringina en combinación con colágeno (defecto correspondiente al maxilar superior) y de una amalgama resultante entre la combinación entre la naringina y extracto de uva (defecto correspondiente a la mandíbula).

Finalmente, se realizó el cierre de la herida comenzando por el periostio y el plano muscular profundo con puntos sueltos de Coated Vicryl® 4/0. Finalmente tras el lavado de la herida quirúrgica con suero fisiológico, se aplicó un apósito plástico en spray del tipo Nobecutan®.

### **Cuidados postoperatorios**

Los animales fueron depositados en las jaulas para evitar manipulaciones intempestivas así como reacciones incontroladas por parte del animal en las primeras horas tras la intervención. A modo de prevención se realiza una ferulización con inmovilización de las dos patas traseras para prevenir fracturas, con escayola.

El hecho que los conejos han evolucionado como especie presa, ocultando cualquier discapacidad para escapar de la depredación hace que vigilemos con mayor detenimiento cualquier cambio en su comportamiento que puede darse de manera sutil, como un aumento de respiración, su oposición a moverse o hacerlo con cojera o cambio en la marcha, la agresión súbita, la incapacidad para descansar o dormir de forma normal o la disminución de la ingesta de alimentos y agua, el que se frote, lama o rasque en el área de la herida (Mapara et al., 2012). Un dolor excesivo puede prolongar el tiempo de recuperación de una enfermedad o lesión, también puede a raíz del dolor, dejar el conejo de comer e incluso entrar en shock y morir dentro de 24 a 48 horas a pesar de que la enfermedad o lesión en sí misma no puede haber sido mortal.

Nos aseguramos que la sala de recuperación no tuviera ruido, con una temperatura adecuada y luz tenue. La supresión del sufrimiento y el dolor debe ser una de las prioridades en la experimentación animal.

Las evaluaciones para el dolor postoperatorio se deben ejecutar de forma sistemática para determinar si los animales requieren analgésicos. Estas evaluaciones implican un gran número de indicadores tales como: evaluación de la actividad motora; cambios en la apariencia, como

el curling, pelos erizados, y las secreciones de los ojos o la nariz; cambios en el temperamento, el aumento de la agresión, la renuencia a interactuar; cambios en los sonidos emitidos, rechinar o crujiir de dientes, aumento o disminución de los sonidos emitidos; cambios en la cantidad de alimentos o agua que se consume, pérdida de peso, disminución de la orina y la producción de heces; y cambios fisiológicos a los latidos del corazón, la frecuencia respiratoria, la presión arterial, saturación de oxígeno y el color de la piel. El sitio quirúrgico se evaluó para detectar eritema, edema, vertidos, etc, según (Damy et al., 2010).

### **Eutanasia. Obtención de las muestras**

La eutanasia se realizó mediante la administración una sobredosis endovenosa de Tiopental Sódico, solución al 2%, 1 g en 50 ml. de agua destilada (Pentotal) provocando paro cardiorespiratorio y se hizo una vez finalizados los tiempos de estudio, es decir, a los 6 meses tras la cirugía.

Una vez que se comprobó la muerte del animal, se abordó quirúrgicamente y, tras desprender los tejidos blandos, se practicó una osteotomía horizontal, perpendicular al eje tibial, con una sierra oscilante, extrayendo las porciones que abarcaban los orificios con tejido óseo remanente circundante. También se extrayeron las mandíbulas y los maxilares.

### **3.2.3. Protocolo de adquisición mediante microtomografía computerizada y análisis de las muestras**

Tras obtener las muestras, se procedió a su identificación con etiquetas en el que se especificaba el número del conejo, lugar de la muestra (pata derecha, pata izquierda, maxilar, mandíbula) y fecha de sacrificio, para evitar errores, y se depositó en frascos que contienen formol, para su adecuada conservación.

Procedimos, entonces, al análisis a nivel microestructural de la porción de la tibia extraída, maxilar y mandíbula, para ver el compartimento de hueso trabecular y cortical en las zonas del defecto, con el fin de valorar la densidad mineral volumétrica en estas regiones.

Para ello, se escanearon con un microtomógrafo de rayos X de sobremesa, un escáner multimodal SPECT/CT Albira II ARS perteneciente a la Universidad de Murcia. Los parametros de adquisicion fueron 45 Kv, 0,2 mA, voxel de 0.05 mm, con cortes de adquisicion axiales de 0,05 mm de espesor . Se obtuvieron de 800 a 1000 imágenes de cada pieza a través de un detector digital flat panel 2400 x 2400 pixels y un FOV de 70 x 70 mm.

Se aseguró en todo momento que la muestra estuviera perfectamente identificada, a fin de evitar cualquier error o transposición (figura 17).

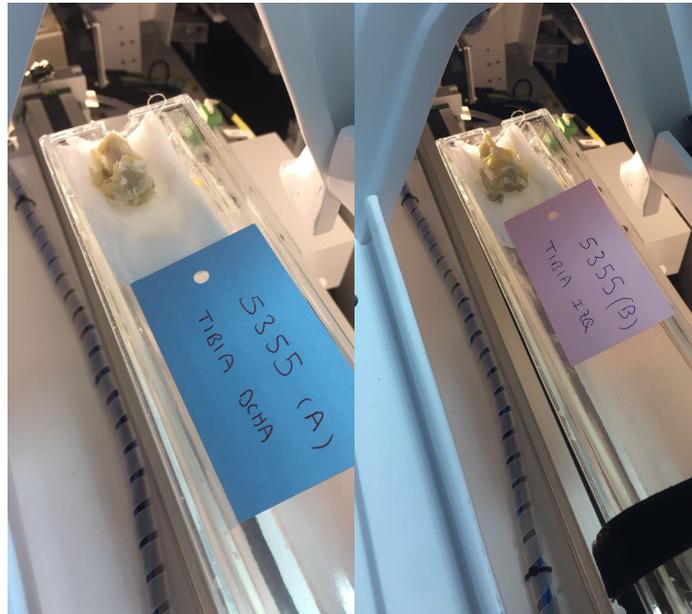


Figura 17. Adquisiciones mediante microtomografía computerizada

Se procedió a reconstruir las imágenes adquiridas con el micro-TC, gracias a un algoritmo FBP (Filtered Back Projection), en los tres planos del espacio. Tras ello, se aplica el programa de imagen Amide (<http://kitware.com/opensource/volview.html>) para una reconstrucción avanzada, también se practicó una reconstrucción en 3D gracias al programa de análisis de imagen Volview (<http://kitware.com/opensource/volview.html>).

Se practicó un estudio visual mediante el programa Volview (figura 18) para determinar los lugares de los defectos y facilitar su localización y, posteriormente, medición, en el programa Volview.

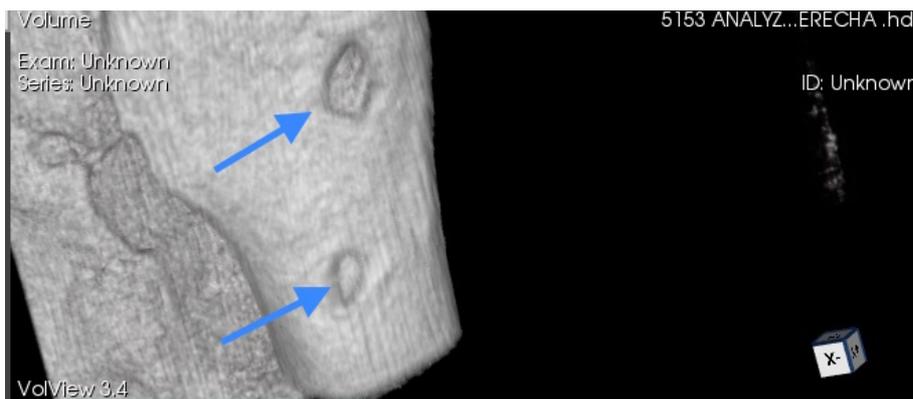


Figura 18. Imagen pata derecha conejo 5153 mediante Volview

A continuación y, con las imágenes obtenidas con el micro-TC y con el programa Amide y, en la zona de las tibias, lo que hacemos es calibrar la imagen para obtener la mayor calidad, usando los diferentes filtros de colores, para poder diferenciar la cortical de forma óptima, ya que su discontinuidad y localización, con la ayuda del estudio a través de Volview, nos indicaba exactamente la zona a medir (figura 19 y 20).

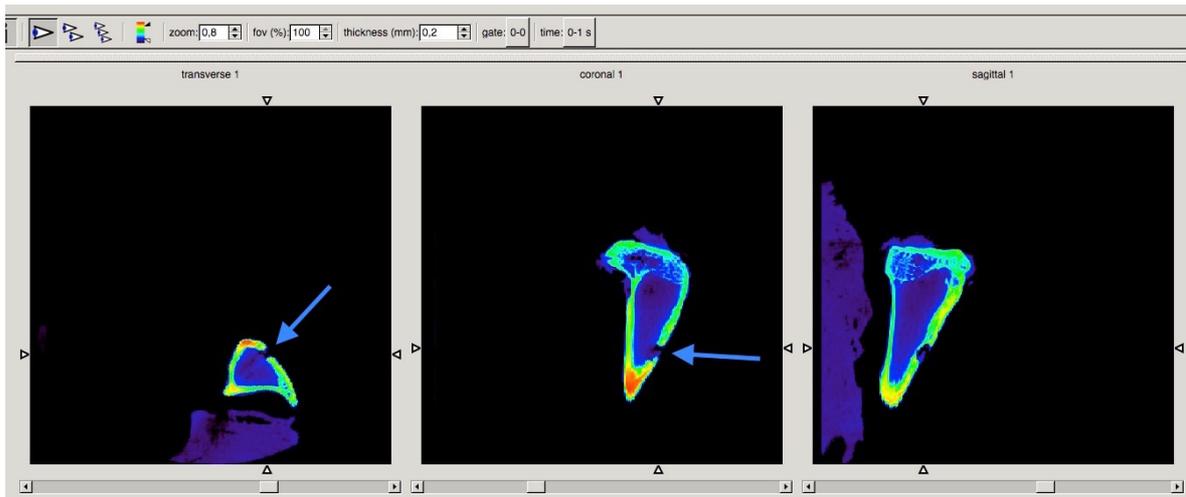


Figura 19. Tibia derecha conejo 5153, orificio superior (Amide)

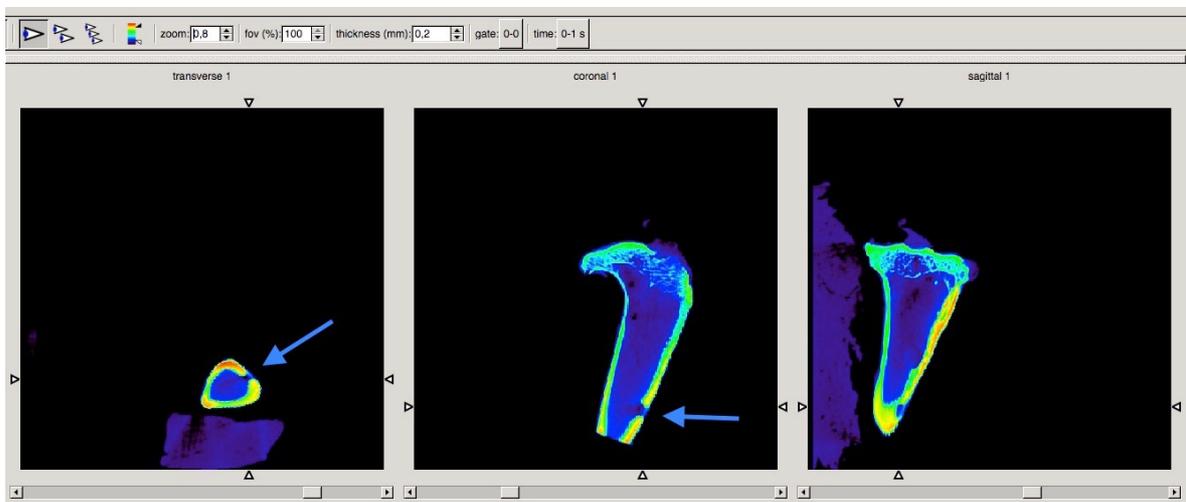


Figura 20. Tibia derecha conejo 5153, orificio inferior (Amide)

Tras ver varias escalas de colorimetría, elegimos un tono verdoso-amarillento para determinar la cortical y un color azul que manifiesta el patrón trabecular.

En la **vista transversal** era donde resultaba más fácil detectar la discontinuidad causada por la rotura de la cortical debido a la trefina, en la vista coronal confirmamos igualmente la misma.

En el maxilar y en la mandíbula hicimos lo mismo, localizamos los sitios del defecto gracias a Volview (figuras 21 y 22). En Amide tomamos como referencia localizar el incisivo contralateral, en su porción media, para, acto seguido, situarnos en la zona del defecto y, de esta manera, sabemos su ubicación aproximada, lo que nos facilita a localizar con precisión los márgenes del defecto (figuras 23, 24, 25 y 26).

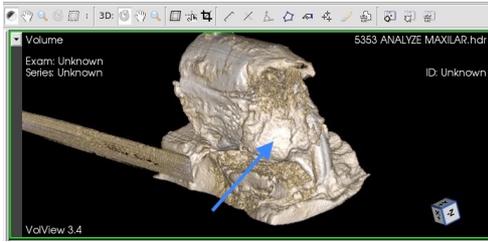


Figura 21. Maxilar (Volview)

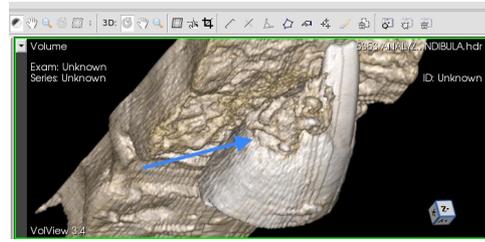


Figura 22. Mandíbula (Volview)

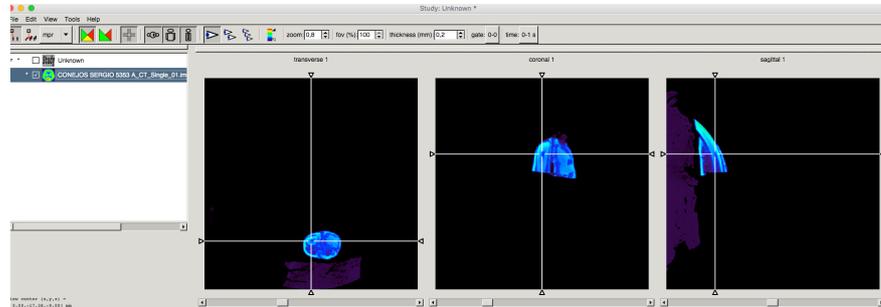


Figura 23. Mandíbula 5353, localización incisivo contralateral

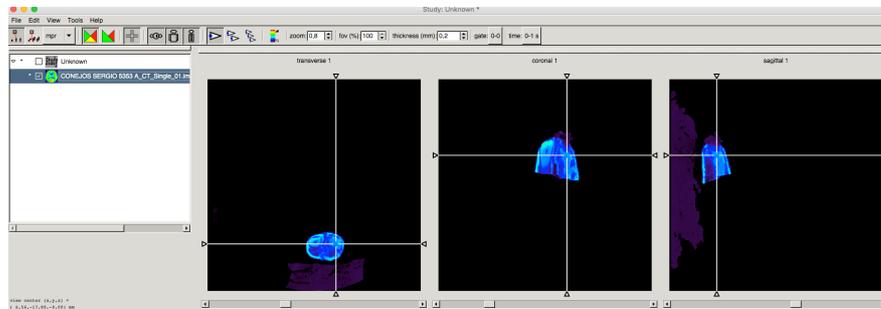


Figura 24. Mandíbula 5353, localización zona defecto

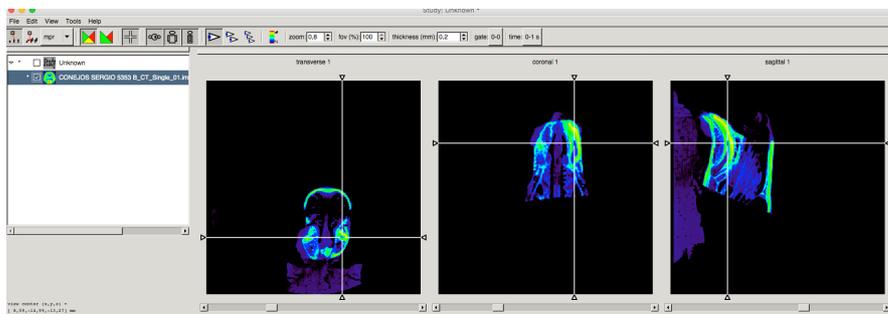


Figura 25. Maxilar 5353, incisivo contralateral

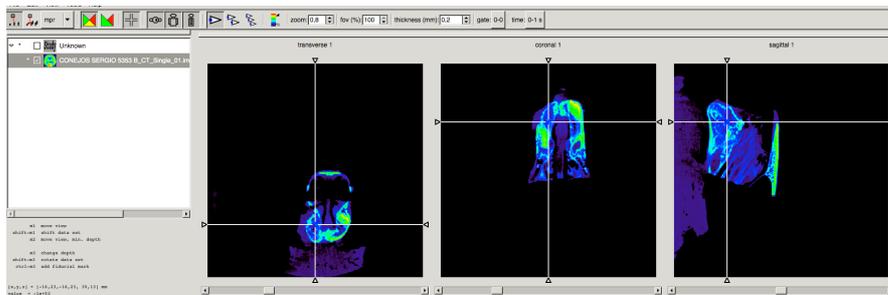


Figura 26. Maxilar 5353, localización zona defecto

Una vez localizados los lugares del defecto con suficiente calidad interpretativa de cara al diagnóstico, procedemos a su medición.

### Análisis estadístico descriptivo

Para calcular la densidad en valores numéricos, unidades Hounsfield (HU), que corresponde a una zona concreta en los lechos de las tibias hemos trazado 6 líneas en el eje coronal, que contuvieran los valores numéricos en unidades Hounsfield de los voxels que atraviesan de forma perpendicular la entrada del defecto. Lo hemos hecho desde la porción que existe encima del límite superior del defecto hasta la porción que hay debajo del límite inferior del defecto (figura 27).

En la mandíbula y maxilar hemos trazado trazamos 7 líneas en el eje transversal, abarcando toda la hemimandíbula de un lado y del otro, para comparar ambos lados. Hemos abarcado la totalidad de la mandíbula, mientras que en el maxilar hemos acotado las líneas a aquellas que pasan en la zona del defecto y circundante, eliminando gran parte del área que escapa a la zona del estudio, como se aprecian en las imágenes (figuras 28 y 29).

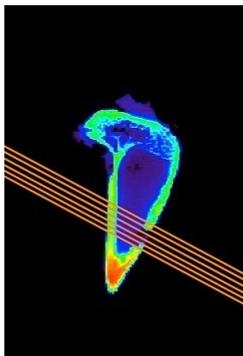


Figura 27. Líneas en corte coronal que atraviesan la zona del defecto

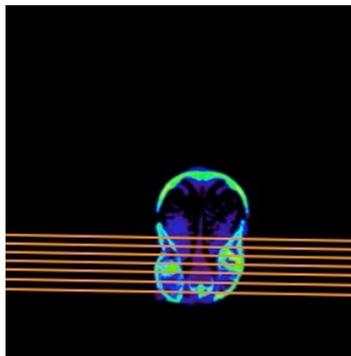


Figura 28. Líneas en corte transversal que atraviesan la zona del defecto, maxilar

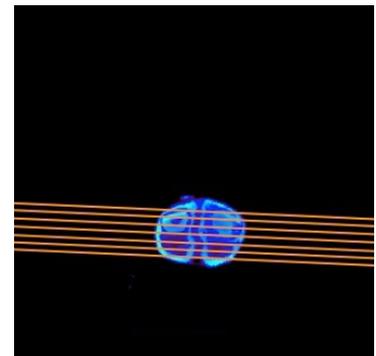


Figura 29. Líneas en corte transversal que atraviesan la zona del defecto, mandíbula

En el caso de las líneas interpretamos estadísticamente el valor de de la densidad, mediante histogramas, comparando con las demás líneas, para interpretar analíticamente los cambios que se han producido tras el depósito del biomaterial o no, si es un grupo control.

Para la interpretación estadística, determinamos los valores o unidades Hounsfield (HU) de cada pixel contenido en la línea media representados en una gráfica. Los valores numéricos, trasladados a una hoja de cálculo (Excel, Microsoft) y procesados, nos señalan información estadística relevante. Así, se desecharon los valores numéricos correspondientes a la franja de la línea (1 y 2, color azul, de las figuras 30 y 31) debido a que sus valores negativos se corresponden a la presencia de aire a ambos lados de la cortical. La zona de estudio analítico con los

valores numéricos a estudiar desde el punto de vista de analítica descriptiva se corresponden a los de la franja de la línea 3 (roja, figuras 30 y 31). Si comparamos una línea que pasa por cortical de la tibia (figura 32) con otra de la misma tibia que pasa por la zona del defecto (figura 33) vemos que el pico de densidad disminuye por la presencia del defecto y biomaterial (flecha 4 en figuras 30 y 31, respectivamente).

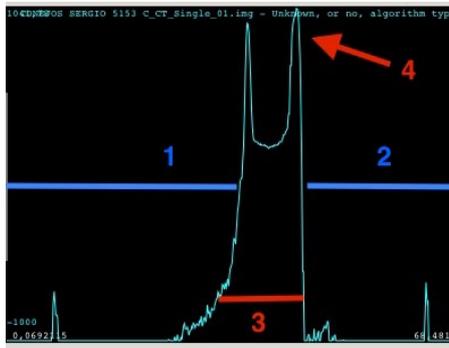


Figura 30. Escala densitométrica zona cortical



Figura 31. Escala densitométrica zona defecto

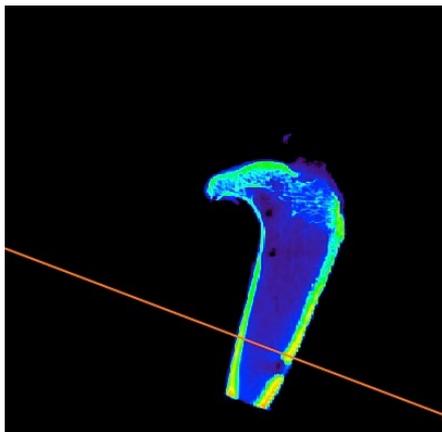


Figura 32. Línea que atraviesa la cortical de

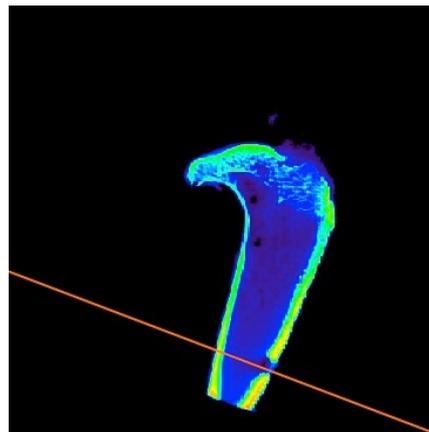


Figura 33. Línea que atraviesa la zona del defecto

## **IV RESULTADOS**



Tras la obtención y posterior procesamiento de datos con el micro-TC de las muestras correspondientes a las tibias, mandíbulas y maxilares superiores de los 7 reactivos biológicos o animales de experimentación realizamos su análisis.

Si bien se contempló la posibilidad de usar un gráfico de barras, que representa el porcentaje en la altura de la barra, finalmente, nos decidimos por el **histograma**, ya que la variable que define las categorías es numérica, donde el porcentaje se representa en el área de la barra y, además, las barras adyacentes están en contacto indicando que la variable es continua.

Así, en nuestro estudio, realizamos varios histogramas obtenidos a partir de los datos del micro-TC de las distintas regiones anatómicas donde se ha hecho el estudio (tibia, maxilar o mandíbula). Por otro lado, son varios histogramas correspondientes a las diferentes líneas trazadas en la zona del defecto. Los datos reflejados corresponden, en el eje de las abscisas, al punto donde se ha realizado la medición, en sentido antero-posterior y, en el eje de la ordenada, a la densidad, en unidades Hounsfield, de esa región específica. Cada histograma tiene a su lado la imagen correspondiente a la línea trazada para orientarnos en todo momento y tener definida la zona del defecto tanto en ubicación como su correspondencia en valores numéricos expresados en el área del histograma. Tomamos como ejemplo la línea 3 trazada sobre la tibia derecha, lecho superior, del conejo 5353 (figura 34).

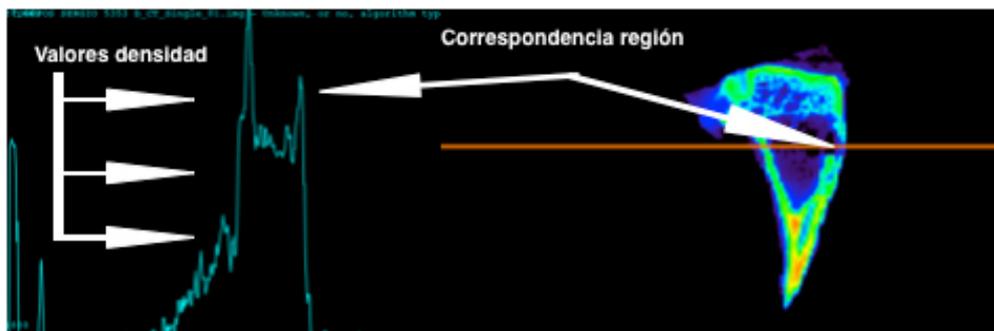


Figura 34. Histograma tibia

Nuestro objetivo, pues, fue comparar los histogramas y sacar conclusiones a partir de los datos numéricos reflejados en estos gráficos que nos indicarán la coherencia de las medidas del micro-TC y el comportamiento de los grupos con biomateriales.

### **Interpretación de las gráficas en general**

A la hora de interpretar las gráficas, compararemos la región correspondiente al defecto con la región vecina en el caso de las tibias, así como el contralateral (donde existirá presencia de incisivo) en el caso de maxilar y mandíbula, a fin de desechar estructuras anatómicas que pudieran interferir en la interpretación de los resultados. Además, en nuestro análisis, valoraremos

todas las líneas pero le daremos mayor importancia a aquellas que atraviesan íntegramente la zona del defecto, normalmente, correspondientes a las líneas 3 y 4 en el caso de las tibias y las líneas 3, 4 y 5 en el caso de maxilares y mandíbulas.

Así, y a modo de ejemplo, en el caso de la tibia derecha, lecho superior, del conejo 5353 tenemos 6 líneas trazadas desde el borde superior a la zona del defecto al borde inferior (figura 35). Vemos en las líneas 1 y 6 los picos de elevados valores numéricos de densidad correspondientes a las corticales que se encuentran en los límites del defecto, reflejados en la gráfica en la parte derecha. La zona importante es la que atraviesa el defecto, en este caso, correspondiente a las líneas 3, 4 y 5. Una vez localizada la franja del biomaterial, valoramos y comparamos respecto a las regiones vecinas si existían valores numéricos altos y, no sólo eso, también valoramos si es un tramo localizado estable, es decir, sin altibajos que podrían indicar una discontinuidad en la zona del defecto. Una vez comparados los gráficos de forma interna (respecto a otros tramos de la misma zona) y de forma externa (respecto a otras líneas de la misma región), determinamos estas posibilidades en concepto de score:

**(0)** zona de baja densidad o similar al resto de las regiones, **(1+)**, hay indicios suficientes que indiquen valores numéricos más altos y/o estabilidad en la franja de este tramo, respecto a la zona vecina en el caso de las tibias y contralateral en el caso de maxilar y mandíbula, **(2+)**, hay indicios claros que indican valores numéricos más altos y/o estabilidad en la franja de este tramo, respecto a la zona vecina en el caso de las tibias y contralateral en el caso de maxilar y mandíbula.

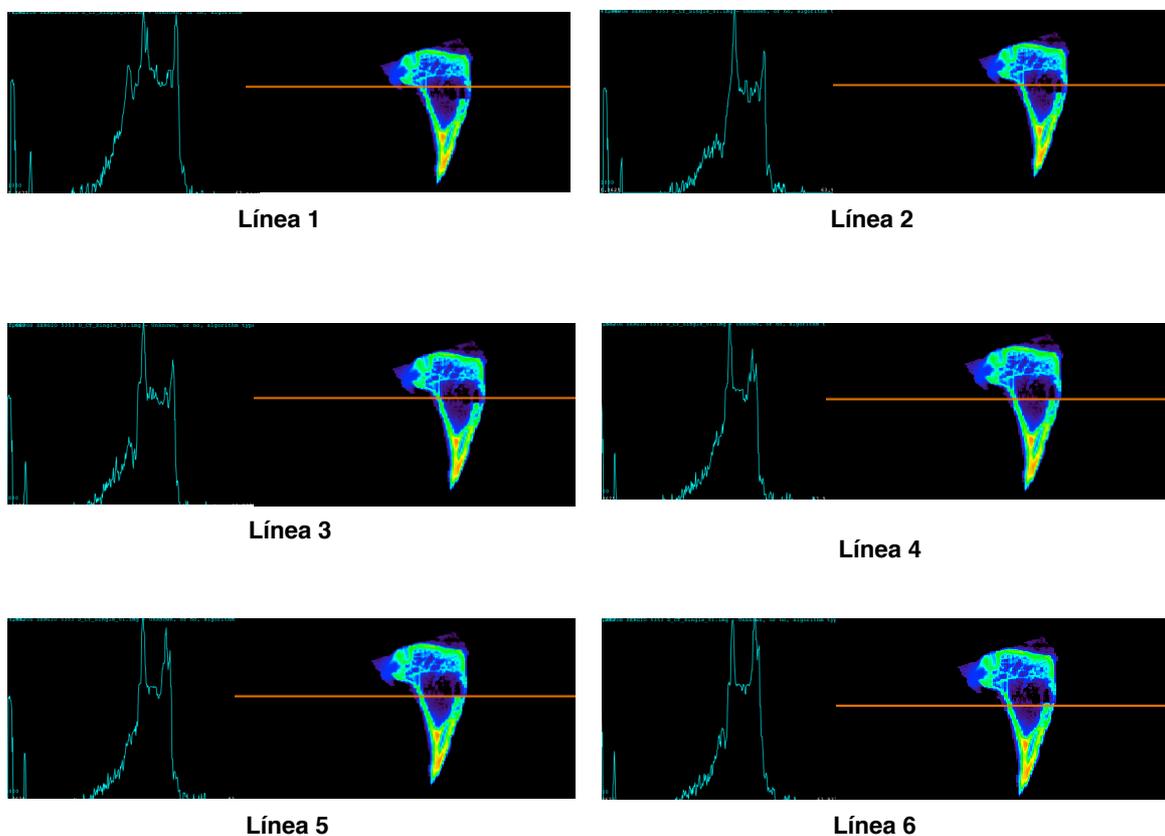
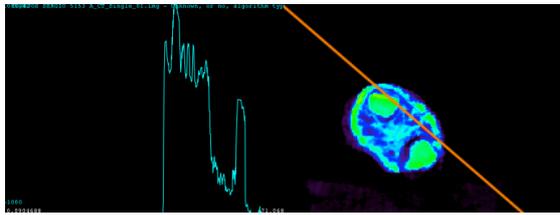


Figura 35. Tibia sujeto 5353

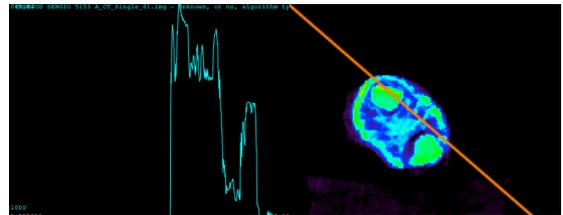
De esta manera y, a modo de ejemplo, en las imágenes de la figura 35 se observa un pico muy elevado a la derecha del histograma en las líneas 1 y 6, correspondientes a la corticales que limitan el defecto. Vemos que la zona que atraviesa el defecto, correspondientes a las líneas 2, 3, 4 y 5, presentan picos de densidad más elevados que la región vecina, habida cuenta que el pico situado totalmente a la izquierda se corresponde a la cortical del otro lado de la tibia y no debemos considerar este dato. Además, la zona atribuible al defecto no sólo presenta valores más altos, sino que la línea 4 mantiene una breve franja estable, que indica estabilidad, a nivel densitométrico. Por este motivo, esta región sería catalogado como score **(2+)**.

Además de valorar el comportamiento de los biomateriales, valoramos la **concordancia de los valores del micro-TC**. En este caso, se detectaba claramente la presencia de hueso cortical y trabecular en la trayectoria del vector, ilustrando una menor densidad mineral ósea para el hueso trabecular y una alta densidad mineral ósea para el hueso cortical. A continuación, describiremos lo que vimos en los histogramas de todas las muestras obtenidas.

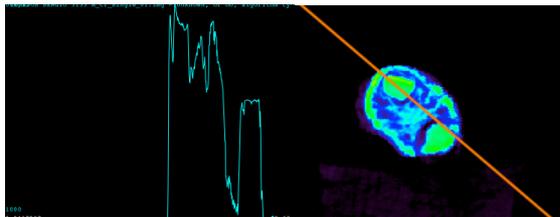
## 5153 Mandíbula (Naringina+extracto de uva)



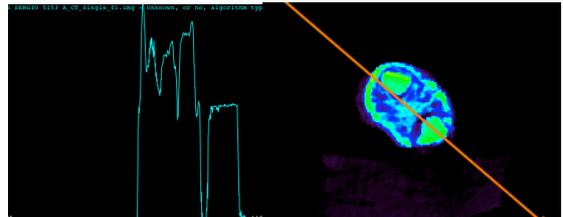
Línea 1



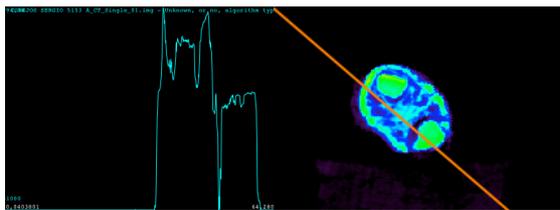
Línea 2



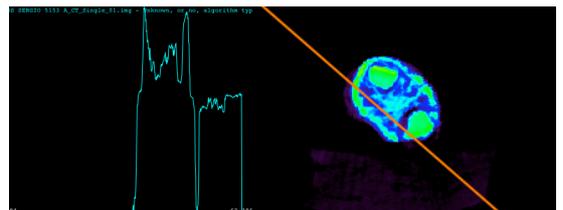
Línea 3



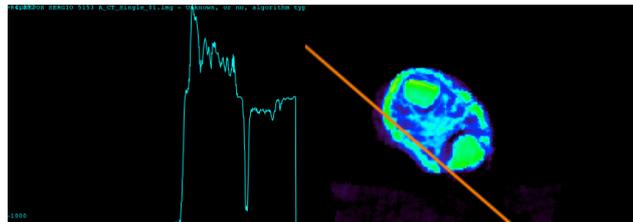
Línea 4



Línea 5



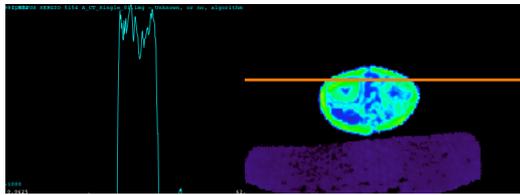
Línea 6



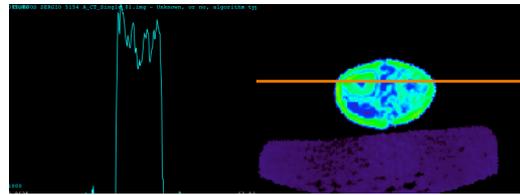
Línea 7

En la línea 1 observamos picos de subida y bajada en la zona izquierda, correspondientes al lado contralateral del defecto, a continuación, aparecía una zona de transición (con caída de los valores numéricos en HU) para volver a subir en la zona del defecto. En la línea 2 ocurría lo mismo, pero empezaba a subir la densidad antes, atribuible a que la línea empieza a abarcar más zona del defecto. En la línea 3, la zona del defecto se manifestaba por una composición uniforme, con valores densitométricos altos, si bien la franja era pequeña. En la línea 4 es donde se observaba la mayor franja con uniformidad en valores HU y de manera estable. En la línea 5 la franja correspondiente al defecto aumentaba pero también manifestaba picos de discontinuidades pequeños tendiendo a la subida en valores numéricos.

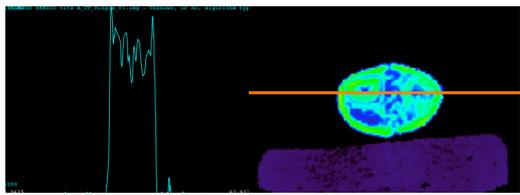
## 5154 Mandíbula (Naringina+extracto de uva)



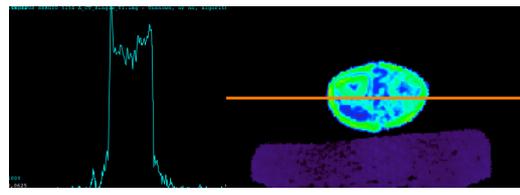
Línea 1



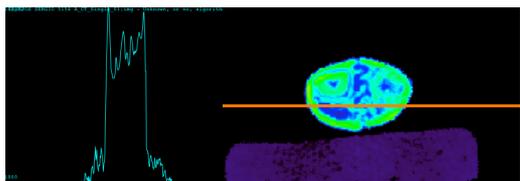
Línea 2



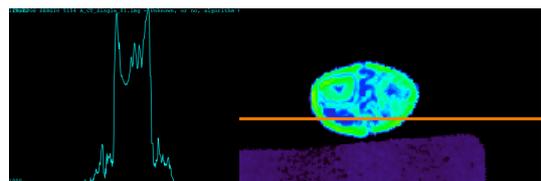
Línea 3



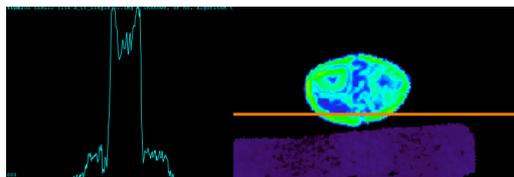
Línea 4



Línea 5



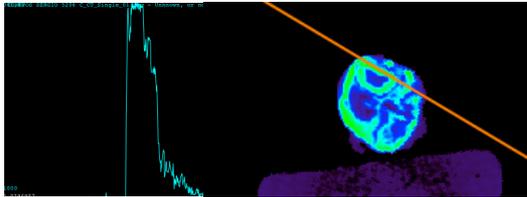
Línea 6



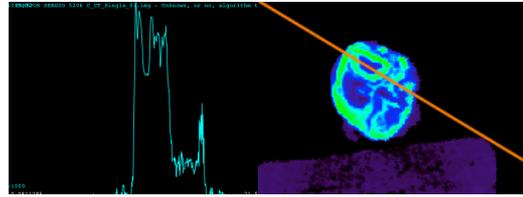
Línea 7

En la línea 1 se observaban picos de densidad discontinuos en la zona del lado contralateral, tras una breve caída en valores numéricos, volvía a subir la densidad en la zona atribuible al defecto. Este patrón lo seguía también la línea 2. En la línea 3, las discontinuidades eran más pronunciadas, manteniendo aún un perfil alto. En la línea 4 se observaba, tras la zona del defecto, una subida en valores de densidad y una estabilidad creciente. En la línea 5, los valores de la zona del defecto eran más altos que en el lado contralateral, por lo general. La línea 6 mostraba prácticamente el mismo patrón de comportamiento que la línea 5. En la línea 7, se observaban dos zonas diferenciadas, la de la zona contralateral y la del defecto, con valores densitométricos altos.

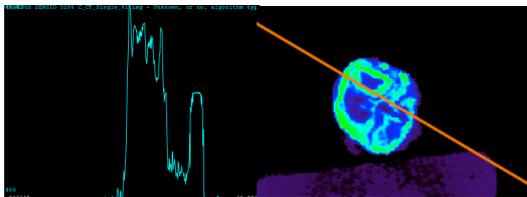
## 5206 Mandíbula (Naringina+extracto de uva)



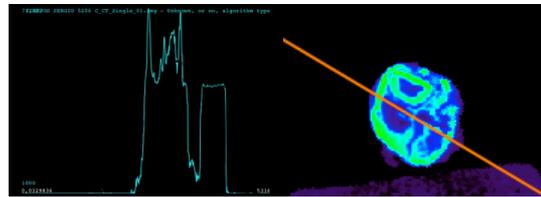
Línea 1



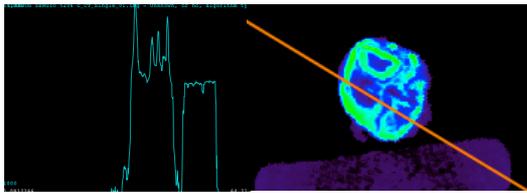
Línea 2



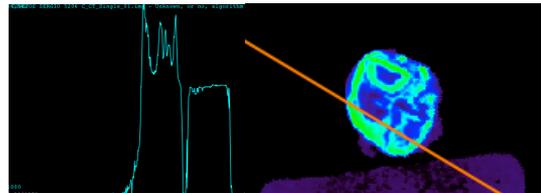
Línea 3



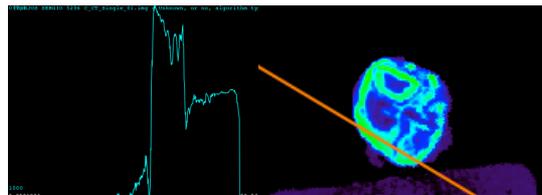
Línea 4



Línea 5



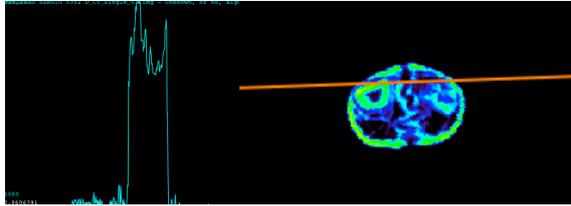
Línea 6



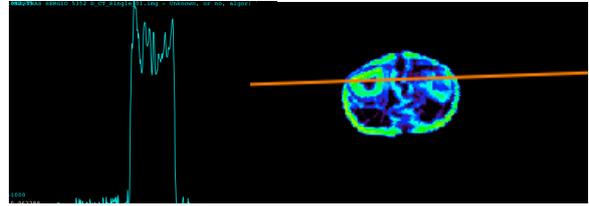
Línea 7

En la línea 1, tras valores numéricos muy altos a nivel de densidad en la zona atribuible al lado contralateral, vimos que decaían a niveles muy bajos en la zona del defecto. En la línea 2, la franja del defecto seguía presentando valores muy bajos, aunque existía un pico de subida en densidad. En la línea 3, el pico de densidad aumentaba en valor numérico y la franja es más grande, más estable. En la línea 6 la franja aumentaba, tras una zona claramente delimitada con picos discontinuos altos del lado contralateral y la correspondiente a la zona del defecto. La línea 7 mostaba una franja muy estables con valores densitométricos medios.

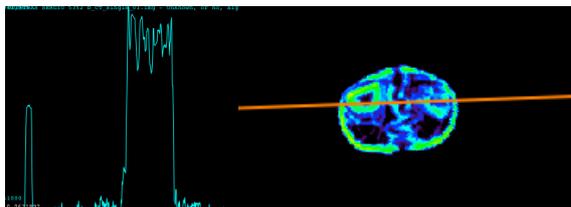
## 5352 Mandíbula (Naringina+extracto de uva)



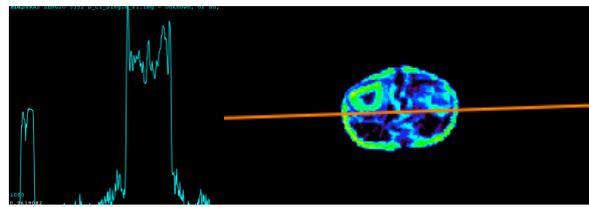
Línea 1



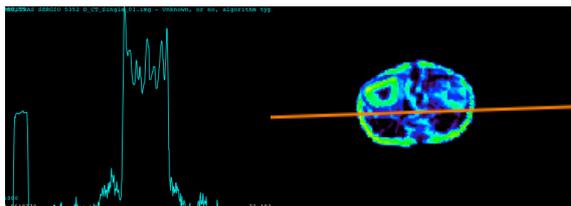
Línea 2



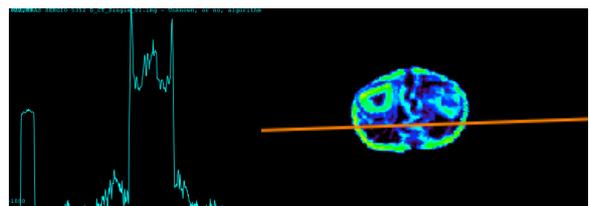
Línea 3



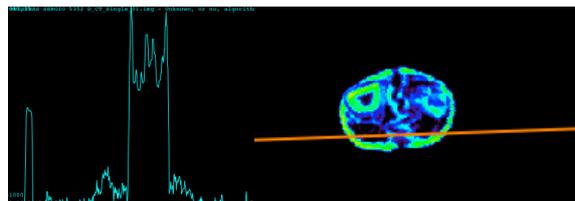
Línea 4



Línea 5



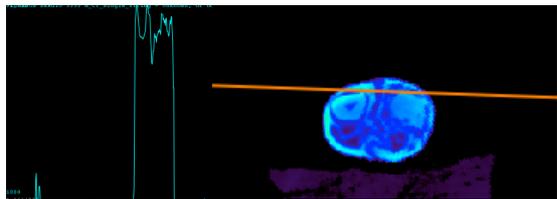
Línea 6



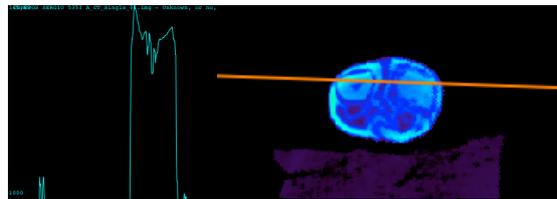
Línea 7

En la línea 1 vimos una zona con picos numéricos altos en términos de densidad y, luego, caía levemente para volver a subir. En la línea 2, habían muchas discontinuidades en ambas franjas, contralateral y zona defecto, siempre con valores altos, al igual que en la línea 3. En la línea 4 ocurría lo mismo, pero el valor numérico decaía levemente, hasta volver a subir de nuevo. En la línea 5 los valores eran relativamente altos en toda la franja, con discontinuidades. En la línea 6, la zona de mayor densidad estable era la zona del centro. En la línea 7, los picos eran discontinuos y mostraban valores altos al principio, en el centro y al final.

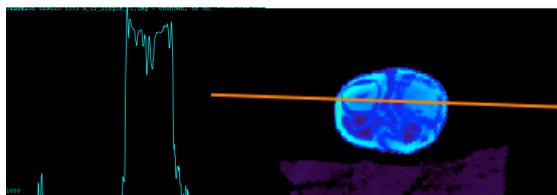
## 5353 Mandíbula (Naringina+extracto de uva)



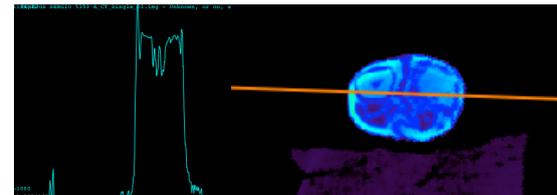
Línea 1



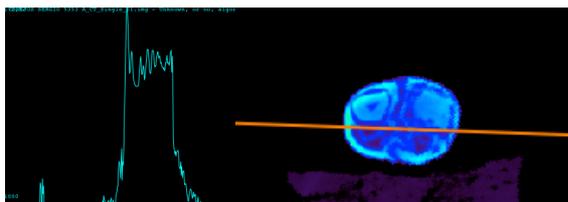
Línea 2



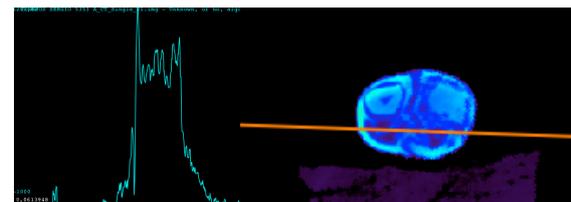
Línea 3



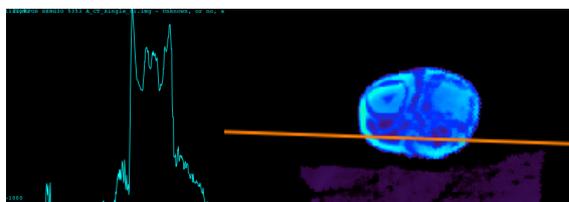
Línea 4



Línea 5



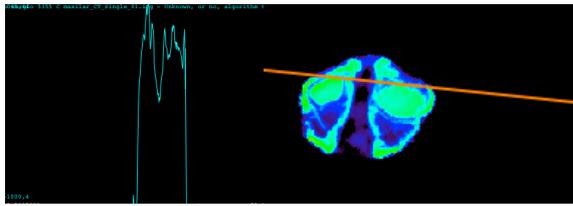
Línea 6



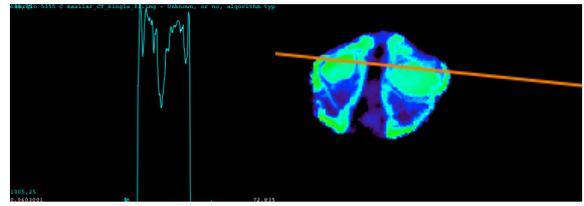
Línea 7

En la línea 1 se observaban 2 franjas, al comienzo con 2 picos altos, seguida de una breve caída para, a continuación, subir en valores densitométricos. En la línea 2, la segunda franja, correspondiente a la zona del defecto, mostraba estabilidad con altos valores numéricos, algo que sucedía después de una breve caída en la zona media, atribuible a la zona que existe antes del defecto. En la línea 3 y 4 ocurría lo mismo. En la línea 5 y 6, sin embargo, excepto un valor alto al principio, toda la franja presentaba discontinuidades con valores numéricos altos y medios. La línea 7 mostraba una subida en valores al principio y al final, el resto estaba en valores densitométricos medios.

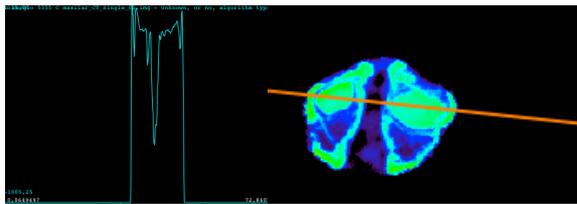
## 5355 Mandíbula (Naringina+extracto de uva)



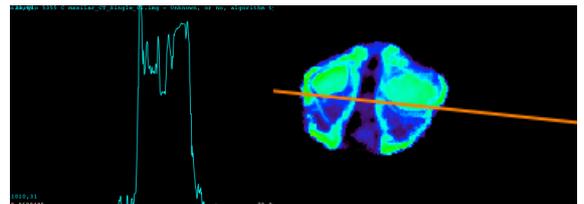
Línea 1



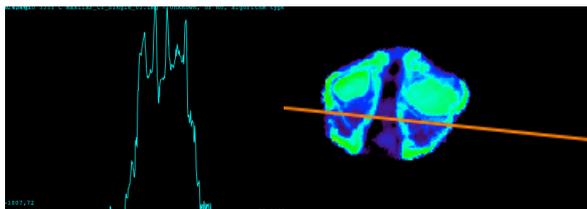
Línea 2



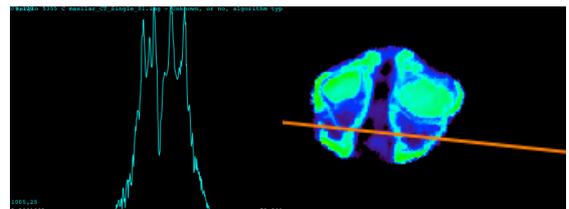
Línea 3



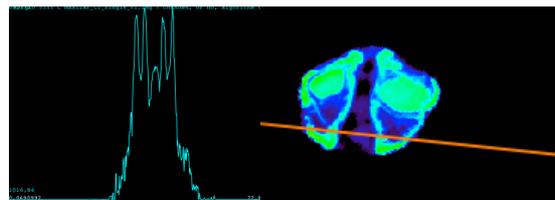
Línea 4



Línea 5



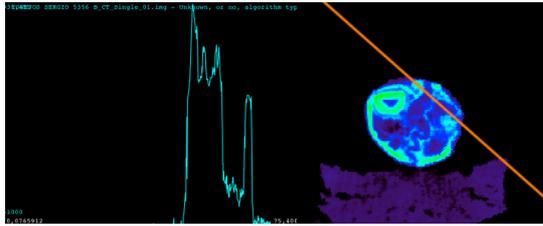
Línea 6



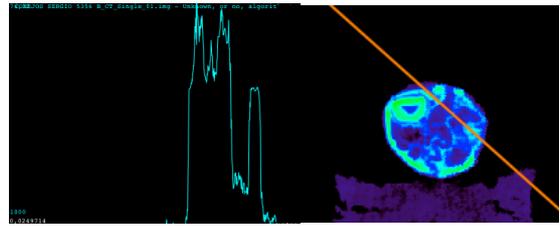
Línea 7

En la línea 1 vimos una zona con picos altos en valores de densidad, una caída y, luego, volvía a subir en valores de densidad en la zona atribuible al defecto. En la línea 2, las dos franjas aparecían delimitadas, ambas con valores densitométricos altos. En la línea 3, las 2 franjas subían a nivel de densidad y aparecían estables y delimitadas, separadas por la caída brusca de densidad en la zona media. En la línea 4, las franjas decaían en valores numéricos de forma leve y la línea de caída de densidad en la zona media desaparecía. En las líneas 5, 6 y 7 aparecían muchas picos en toda la gráfica, con valores medios-altos.

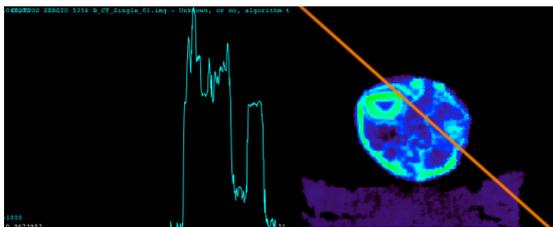
## 5356 Mandíbula (Naringina+extracto de uva)



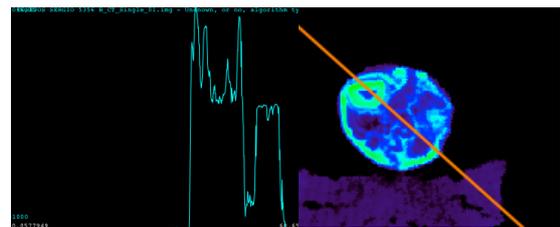
Línea 1



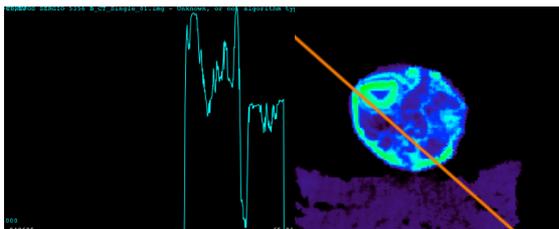
Línea 2



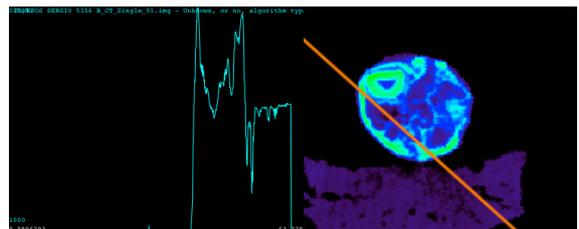
Línea 3



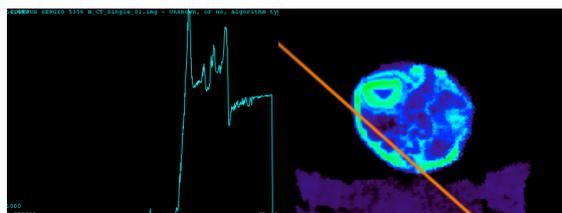
Línea 4



Línea 5



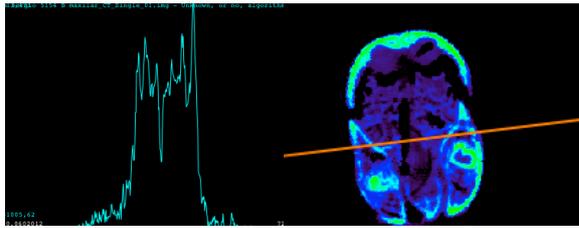
Línea 6



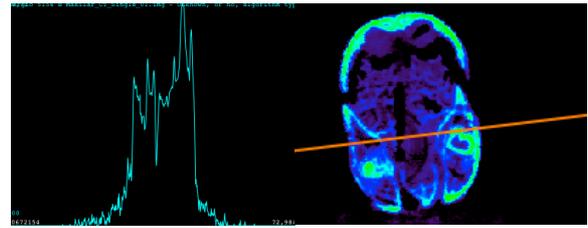
Línea 7

En la línea 1 se veía una franja con altos numéricos en términos de densidad, seguida de una caída importante, seguida de una subida, con una franja muy limitada. En la línea 2 la franja se ampliaba levemente, al igual que en las líneas 3, 4 y 5, donde se veían 2 franjas, una con valores discontinuos altos, seguida de una caída importante para, a continuación tener una franja con valores medios. En la línea 7 no existía una caída de densidad tan importante entre las dos franjas.

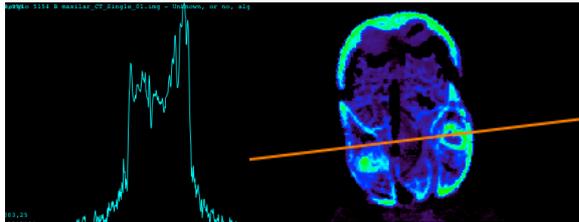
## 5153 Maxilar (Naringina+colágeno)



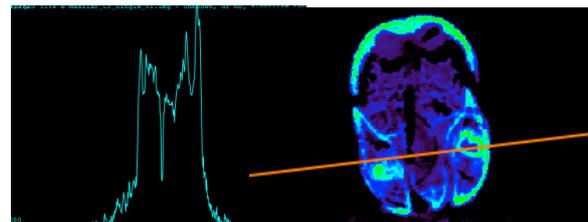
Línea 1



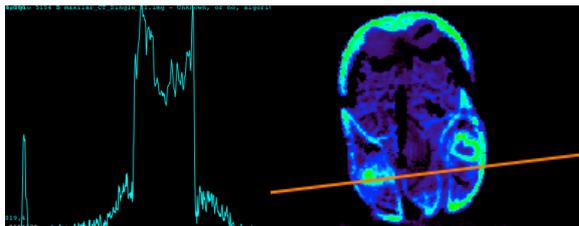
Línea 2



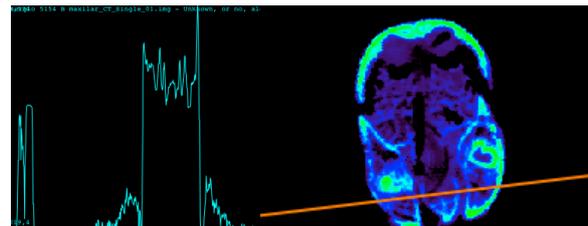
Línea 3



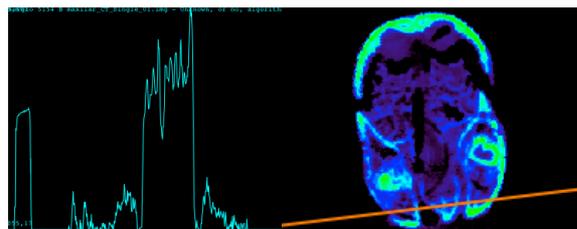
Línea 4



Línea 5



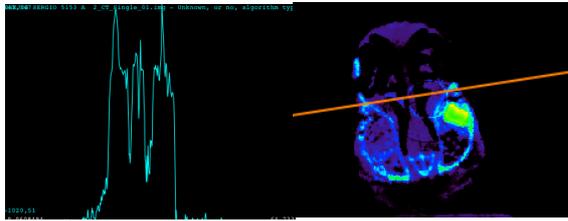
Línea 6



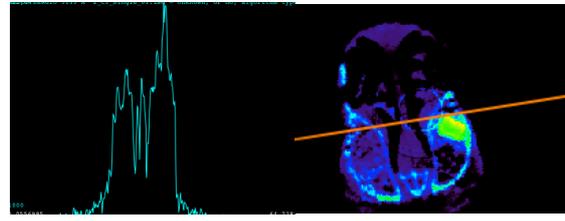
Línea 7

En la línea 1 se observaban varias líneas discontinuas, con picos tanto altos como bajos en valores densitométricos, principalmente altos. En la línea 2 se observaba en la zona del defecto, que estaba en el lado izquierdo, valores numéricos altos, seguida de una breve caída para, a continuación volver a subir, en la zona del lado contralateral. En la línea 3 se observaba una breve franja con valores numéricos medios en la zona del defecto para, después subir conforme avanza la gráfica, lo mismo ocurre en las líneas 4 y 5. En la línea 6 se veía que en la zona del defecto los valores numéricos habían aumentado, por encima del lado contralateral, lo mismo ocurría en la línea 7.

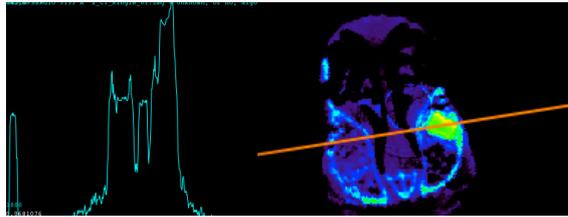
## 5154 Maxilar (Naringina+colágeno)



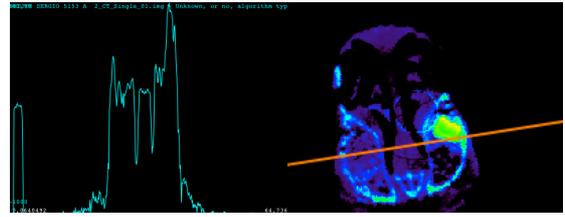
Línea 1



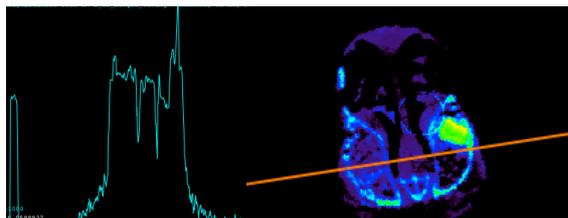
Línea 2



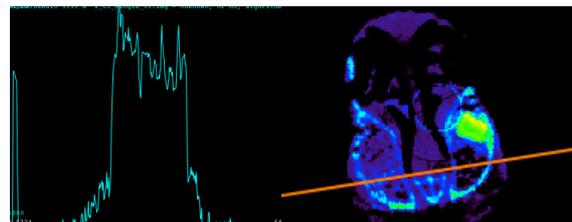
Línea 3



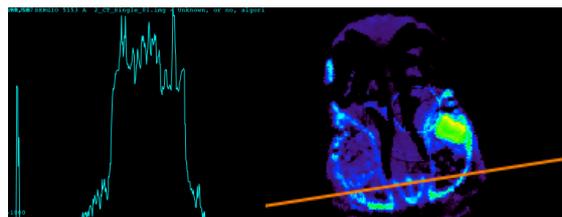
Línea 4



Línea 5



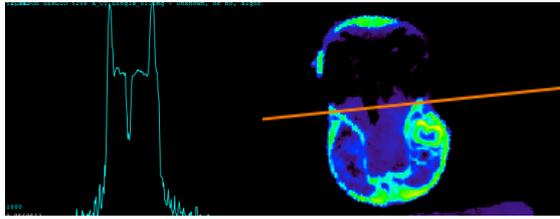
Línea 6



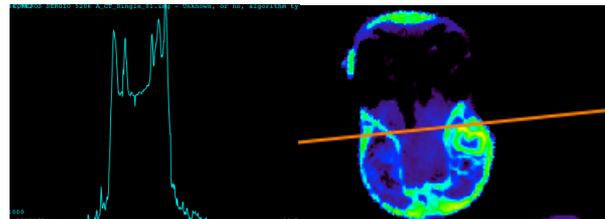
Línea 7

En la línea 1 se veían valores similares, y altos, tanto en la zona atribuible al defecto como en el contralateral, así como en las líneas 2 y 3. En la línea 4 el valor numérico de la parte del defecto se incrementaba, equiparándose al otro lado. En la línea 5 los valores de la zona del defecto superaban a los del lado contralateral. En las líneas 6 y 7 prácticamente ambos lados estaban a la misma altura, con pequeñas discontinuidades, con valores numéricos altos.

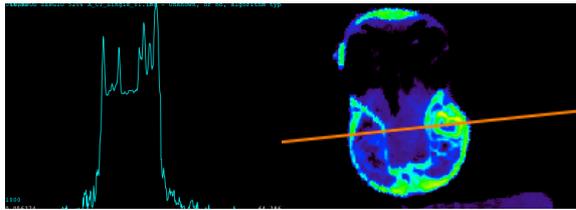
## 5206 Maxilar (Naringina+colágeno)



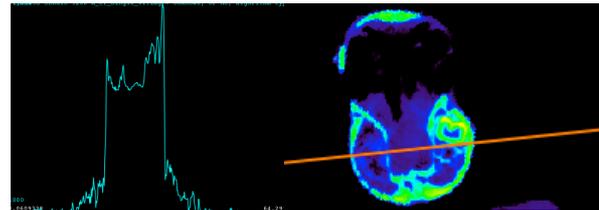
Línea 1



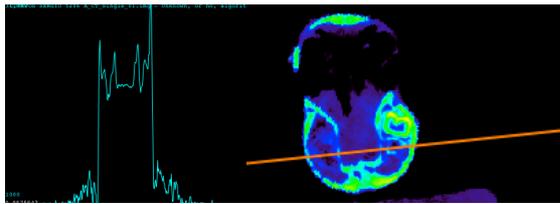
Línea 2



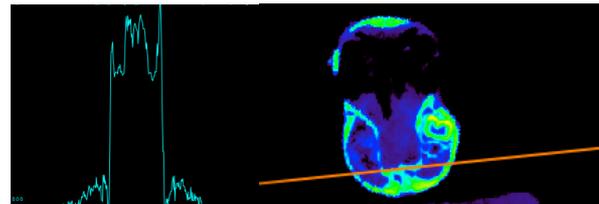
Línea 3



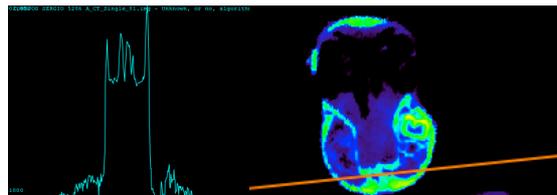
Línea 4



Línea 5



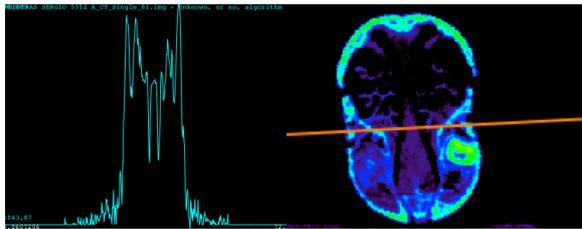
Línea 6



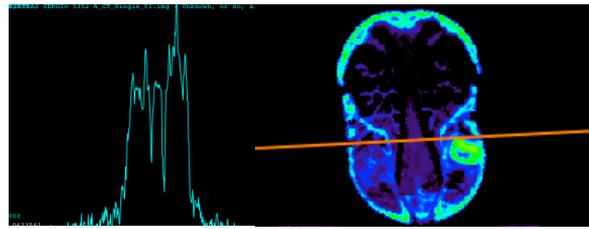
Línea 7

En la línea 1 se observaban 2 franjas similares, separadas por una bajada en el centro, en valores de densidad. En la línea 2 se observaba, sin embargo, una sola franja, con valores altos y discontinuidades tendiendo a la subida, lo mismo ocurría en la líneas 3 y 4, si bien en esta última, los valores más altos se correspondían a la zona contralateral. En las líneas 5, la franja permanecía estable, con picos de subida a ambos lados. En la línea 6 se observaba una subida destacada en términos generales, en especial en la zona media, que volvía a bajar de forma generalizada y sensible en la línea 7.

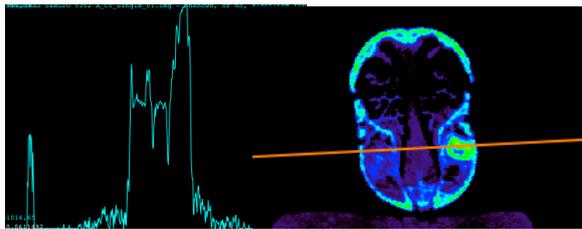
## 5352 Maxilar (Naringina+colágeno)



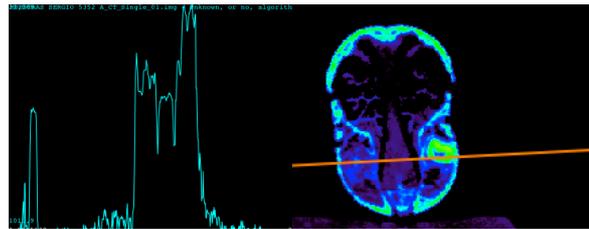
Línea 1



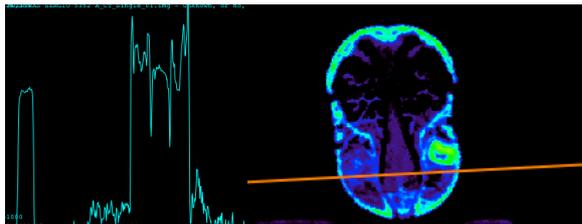
Línea 2



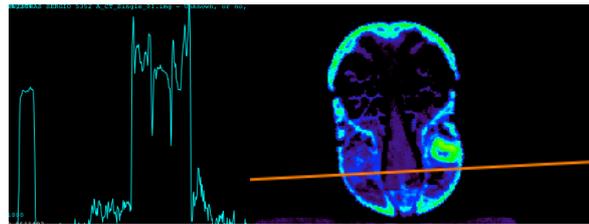
Línea 3



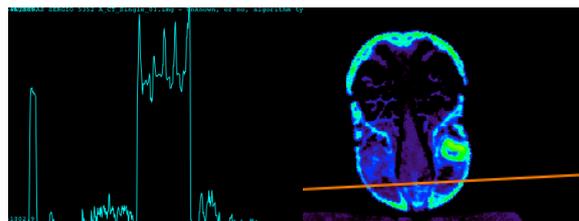
Línea 4



Línea 5



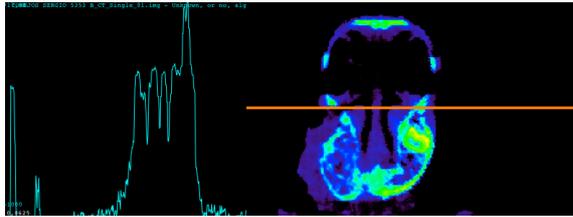
Línea 6



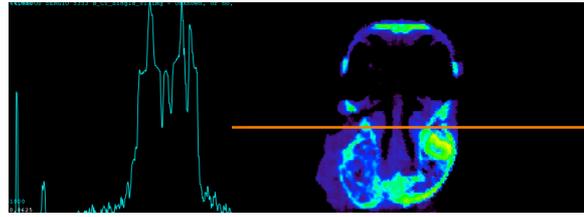
Línea 7

En la línea 1 se observaban valores altos en la zona atribuible al defecto, a continuación existía una caída en el centro, en valores densitométricos, para volver a subir, en la zona contralateral. En la línea 2 seguía un patrón similar, si bien la zona contralateral mostraba valores más altos. En la línea 3, los valores de ambas franjas se estabilizaban, así como en la línea 4. En la línea 5 llamaba la atención la subida en la franja correspondiente a la zona del defecto, algo que se mantenía en la línea 6, en la línea 7 prácticamente toda la franja es similar, a excepción de picos que subían.

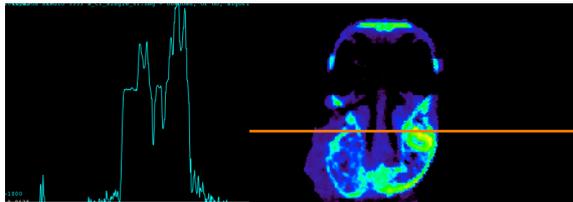
## 5353 Maxilar (Naringina+colágeno)



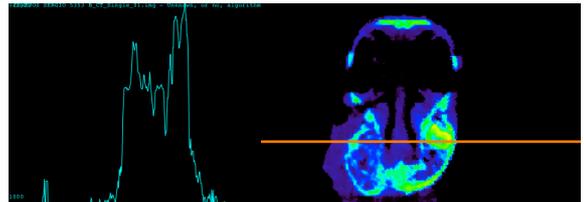
Línea 1



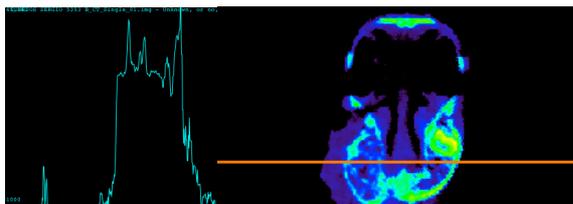
Línea 2



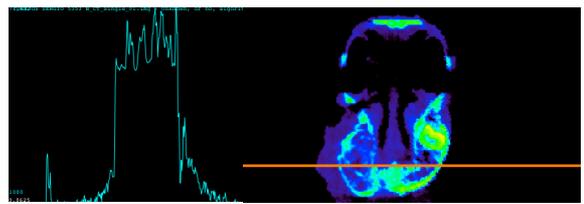
Línea 3



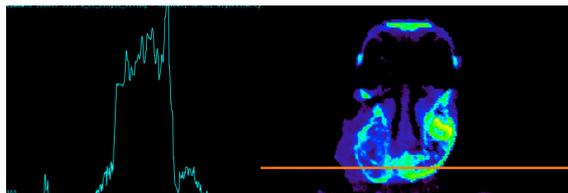
Línea 4



Línea 5



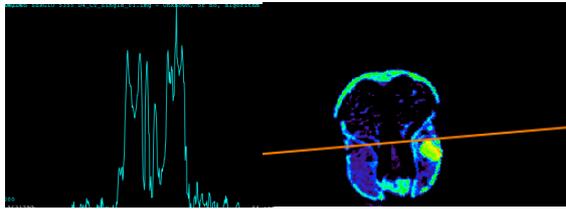
Línea 6



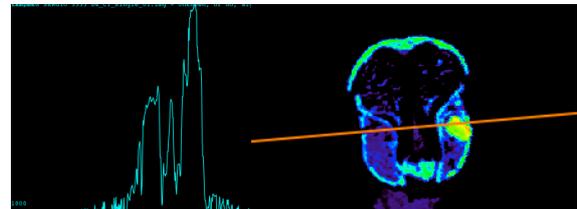
Línea 7

En la línea 1 se veían valores similares en toda la franja, con discontinuidades, a excepción de la zona final, que era más alta. En la línea 2, las discontinuidades con picos altos aparecían tanto en una zona como la otra. En la línea 3 se empezaba a apreciar una separación entre ambas franjas, la del defecto y el contralateral, algo que ocurría también en la línea 4, siendo la zona del lado contralateral la que mostraba valores más elevados. En la línea 5, se observaban picos altos en la zona atribuible al defecto, que también mostraban en la zona contralateral. La líneas 6 y 7 mostraban una única franja con muchos picos ascendentes tanto en una como otra zona.

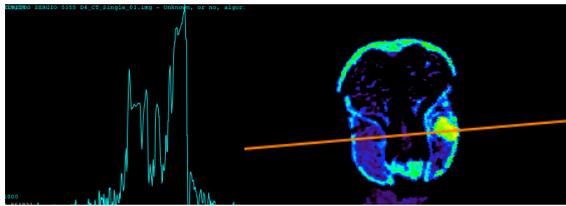
## 5355 Maxilar (Naringina+colágeno)



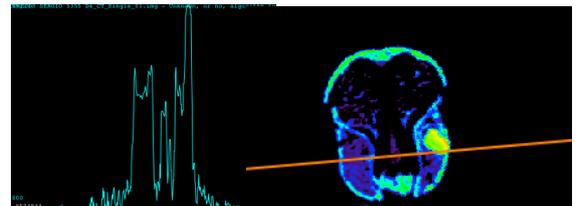
Línea 1



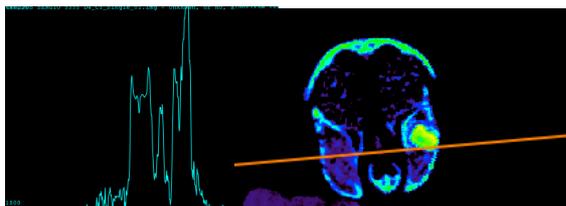
Línea 2



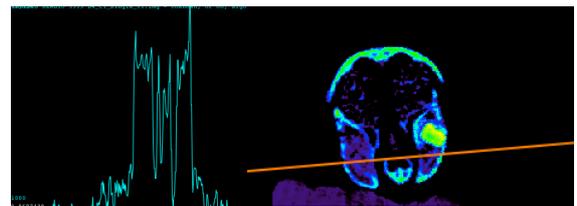
Línea 3



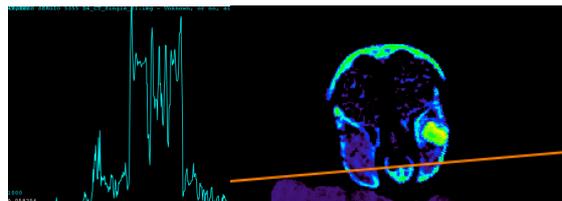
Línea 4



Línea 5



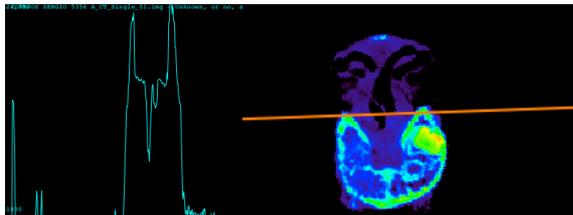
Línea 6



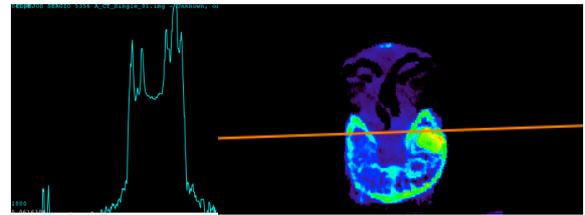
Línea 7

La línea 1 mostraba dos franjas, separadas por una zona de baja densidad, ambas franjas presentaban picos de subida en términos densitométricos. Las líneas 2, 3, 4 y 5 mostraban un patrón similar, si bien la zona del lado contralateral mostraba valores más altos. Las líneas 6 y 7 mostraban una irregularidad continua en toda la franja, con picos que subían y bajaban en toda la franja, si bien la 7 mostraba valores densitométricos más altos.

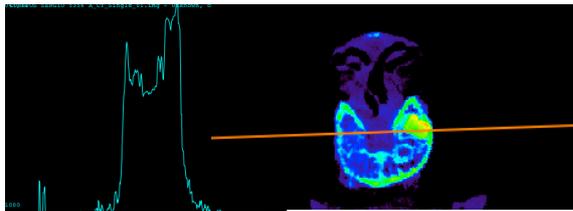
## 5356 Maxilar (Naringina+colágeno)



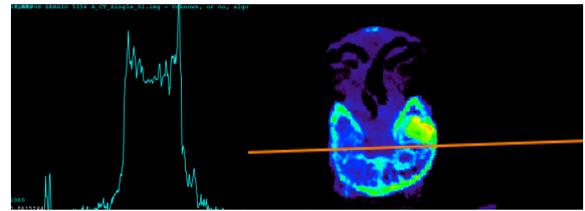
Línea 1



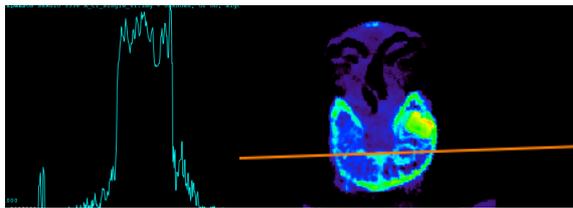
Línea 2



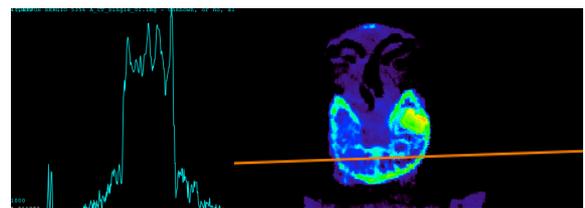
Línea 3



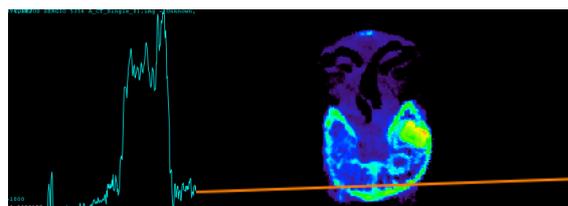
Línea 4



Línea 5



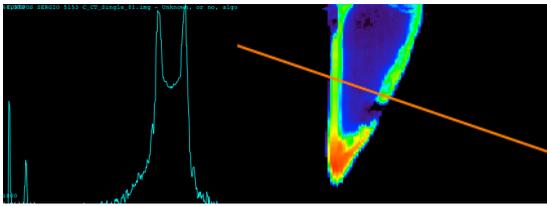
Línea 6



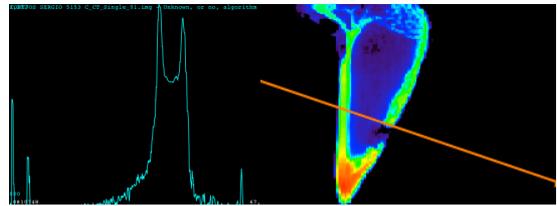
Línea 7

La línea 1 mostraba dos franjas con valores numéricos altos similares en valores, separadas por un pico inferior de densidad. La línea 2 mostraba valores altos pero no había separación y, además, los valores más altos se correspondían a la zona del lado contralateral, algo que ocurría también en la línea 3. La línea 4, sin embargo, vimos que los valores más altos se correspondían en general a la zona del defecto. La línea 5 mostraba una subida importante de densidad en toda la franja, permaneciendo la misma estable, con pequeños picos, esta estabilidad de la franja se manifestaba también en la línea 6, si bien los valores eran sensiblemente más bajos. La línea 7 mostraba valores más bajos en la zona del defecto a los del lado contralateral.

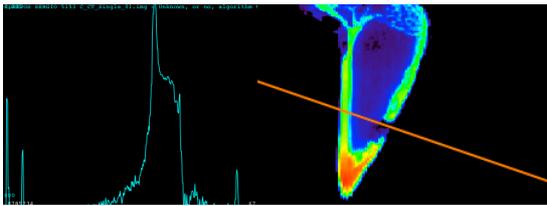
## 5153 Tibia derecha lecho superior (Control)



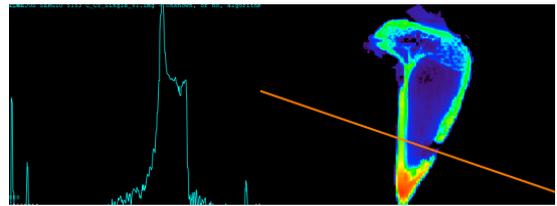
Línea 1



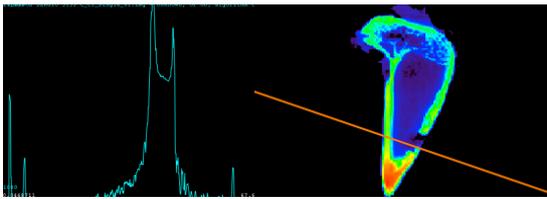
Línea 2



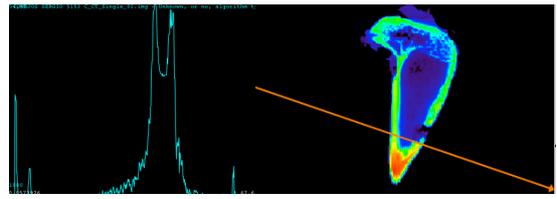
Línea 3



Línea 4



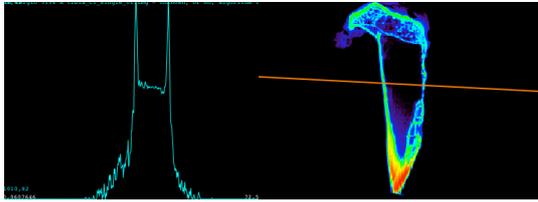
Línea 5



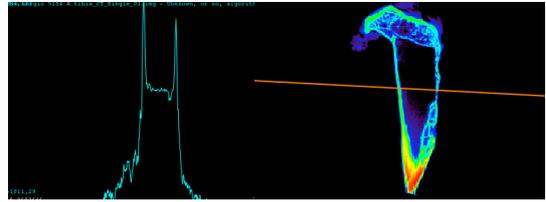
Línea 6

En la línea 1 se veía una franja con altos valores densitométricos con dos picos de subida importantes, tanto al comienzo como al final de la franja, algo que ocurría de igual manera en la línea 2. En la línea 3 se visualizaba una franja donde tiene lugar un comienzo con un valor numérico muy alto, en términos de densidad, igual que la línea 4. La línea 5 mostraba un comienzo alto para estabilizarse y luego volvía a subir, algo que ocurría también en la línea 6, si bien en esta última la franja era más reducida.

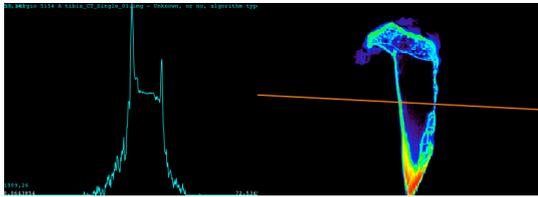
## 5154 Tibia derecha lecho superior (Control)



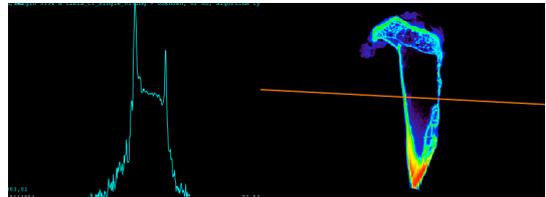
Línea 1



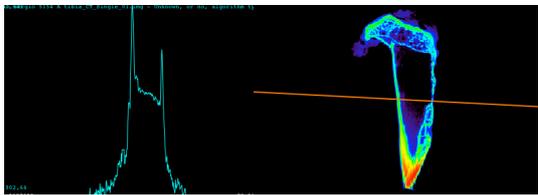
Línea 2



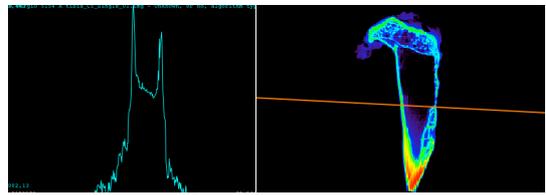
Línea 3



Línea 4



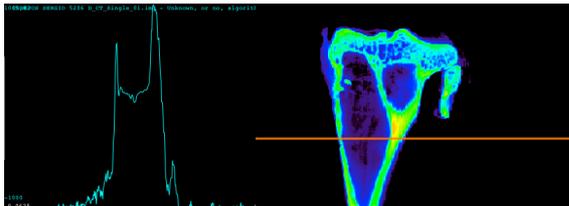
Línea 5



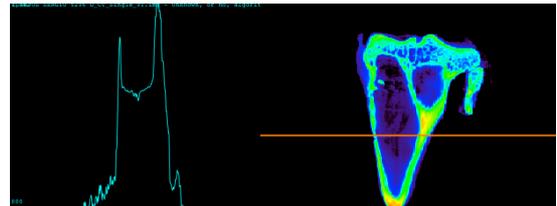
Línea 6

En la línea 1 se veía una franja con un comienzo y final con valor numérico muy alto, respecto a la densidad, lo mismo ocurría en la línea 2. Las líneas 3, 4, 5 y 6 mostraban el mismo perfil de franja, si bien el valor del pico del final disminuía.

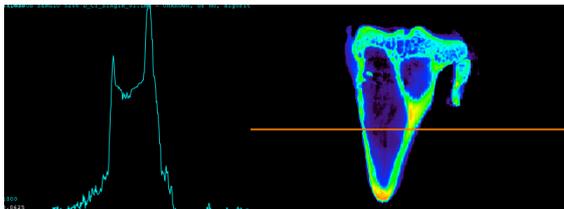
## 5206 Tibia derecha lecho superior (Naringina)



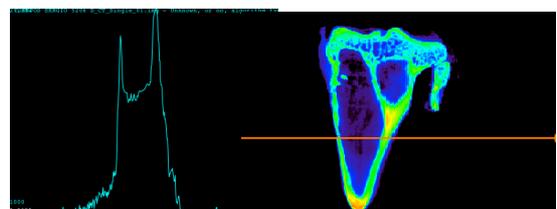
Línea 1



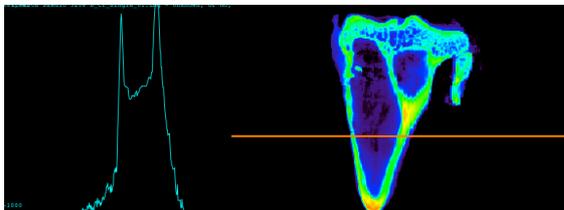
Línea 2



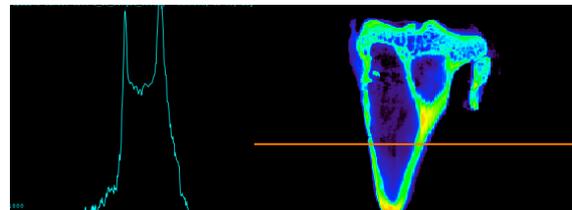
Línea 3



Línea 4



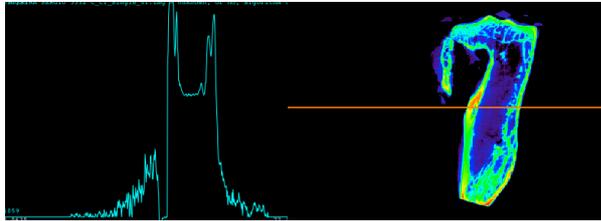
Línea 5



Línea 6

La línea 1 mostraba una subida inicial para estabilizarse a lo largo de la franja y luego mostraba una subida final, en la línea 2 ocurría lo mismo. En la línea 3, la subida inicial disminuía, en la línea 4 la subida inicial aumentaba y alcanzaba su pico máximo en las líneas 5 y 6.

## 5352 Tibia derecha lecho superior (Control)



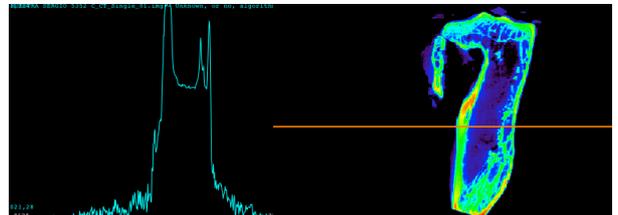
Línea 1



Línea 2



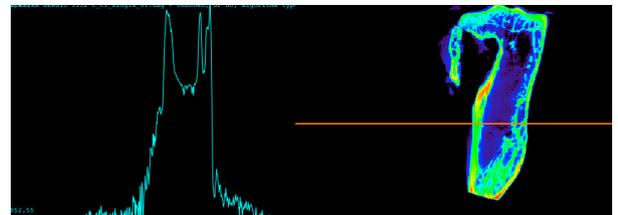
Línea 3



Línea 4



Línea 5



Línea 6

La línea 1 mostraba una franja con un altísimo valor numérico al comienzo, después se estabilizaba y volvía a subir al final, lo mismo ocurría en las líneas 2 y 3. Las líneas 4, 5 y 6 tenían un patrón similar, si bien al final aumentaba el pico de una manera sensible.

## 5353 Tibia derecha lecho superior (Naringina)



Línea 1



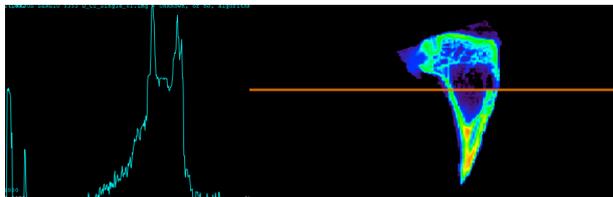
Línea 2



Línea 3



Línea 4



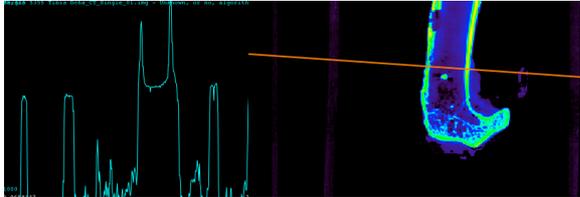
Línea 5



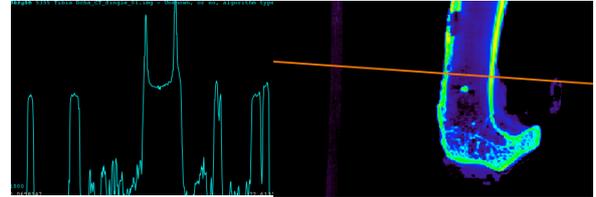
Línea 6

La línea 1 mostraba una franja con un ascenso inicial para, a continuación, mostrar un destacable ascenso en valores numéricos y volvía a caer a valores que no terminaban de ser altos, finalmente volvía a subir de manera puntual. La línea 2 la franja mostraba un valor numérico muy alto de forma inicial, luego se estabilizaba en valores de término medio para, finalmente, volvía a subir sensiblemente, algo que ocurría de manera similar en las líneas 3 y 4. Las líneas 5 y 6 mostraban un ascenso inicial pero también al final de la franja una subida con valores aparentemente similares.

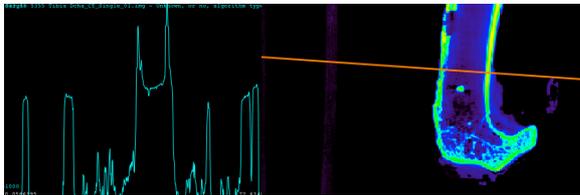
## 5355 Tibia derecha lecho superior (Control)



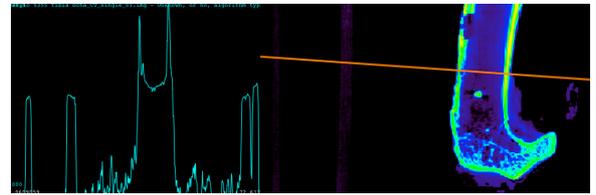
Línea 1



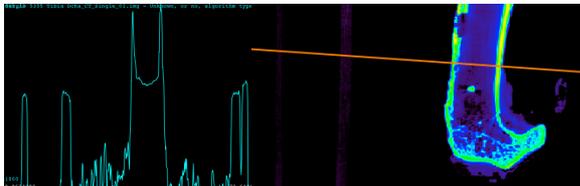
Línea 2



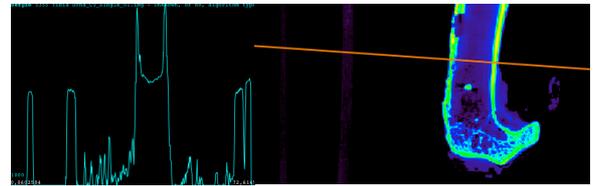
Línea 3



Línea 4



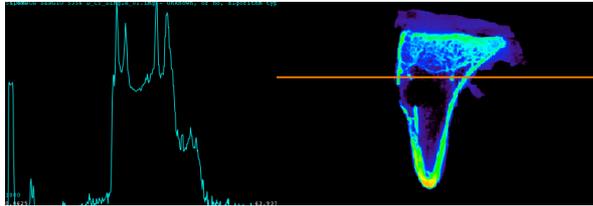
Línea 5



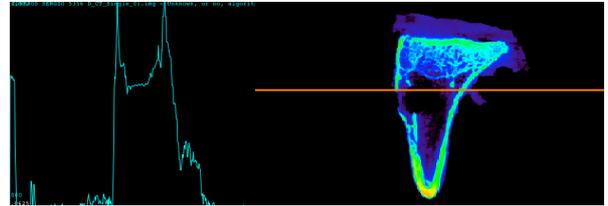
Línea 6

Todas las líneas mostraban un patrón similar consistente en picos discontinuos de valores en términos densitométricos bajos-medios para, posteriormente, mostrar una franja estable con valores medios-altos, con 2 picos al comienzo y al final de subida. Posteriormente, continuaban los picos discontinuos de manera similar de los que ocurrían al comienzo.

## 5356 Tibia derecha lecho superior (Control)



Línea 1



Línea 2



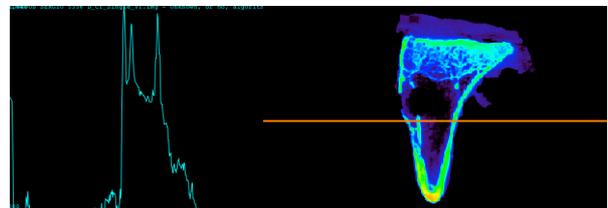
Línea 3



Línea 4



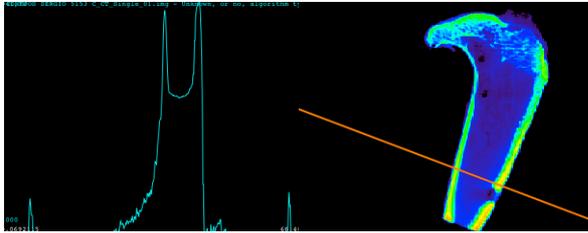
Línea 5



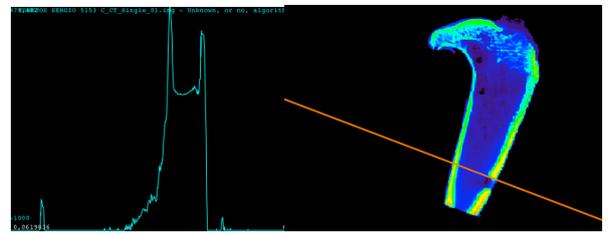
Línea 6

La línea 1 mostraba una subida importante al comienzo, para mantenerse la franja en términos medios-altos y, posteriormente subía de nuevo de manera importante, finalmente, decaía progresivamente, algo que ocurría también en la línea 2 pero en esta última los picos de subida eran menores. La línea 3 mostraba una franja estable con valores altos, mostrando picos de subida casi en el tramo final, para decaer progresivamente. La línea 4 mostraba una franja estable, si bien al final mostraba un patrón levemente irregular con subida y bajada. La línea 5 mostraba un ascenso importante inicial, para decaer a términos medios y volver a subir en el tramo final, luego decaía progresivamente. En la línea 6 los valores iniciales altos eran los que aparentemente son los más altos, junto con la línea 2, luego se estabilizaba, subía de nuevo y bajaba progresivamente.

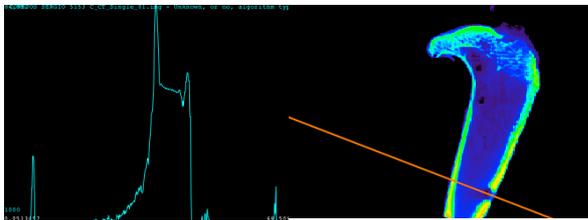
## 5153 Tibia derecha lecho inferior (Naringina)



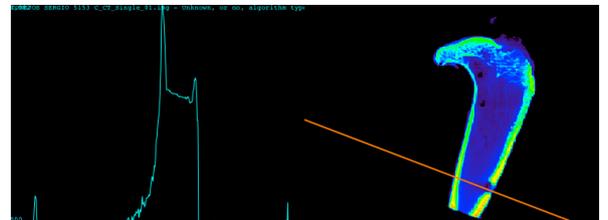
Línea 1



Línea 2



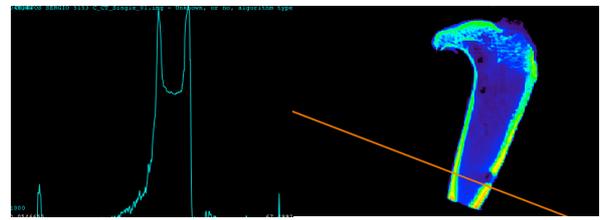
Línea 3



Línea 4



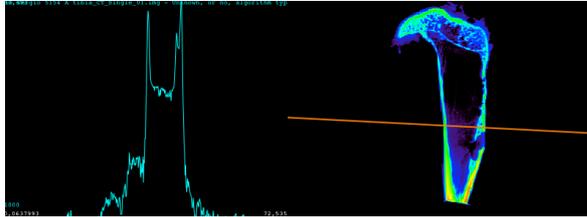
Línea 5



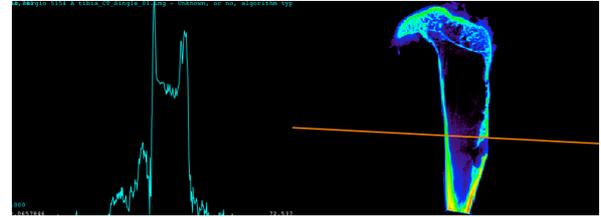
Línea 6

La línea 1 mostraba una franja estable, con pico de subida tanto al comienzo como al final. La línea 2 también pero el pico final era más leve. La línea 3 mostraba una subida importante al comienzo de la franja y luego otra muy tenue al final, algo que ocurría también en la línea 4. Las líneas 5 y 6 mostraban picos de subida tanto al comienzo como al final de la franja.

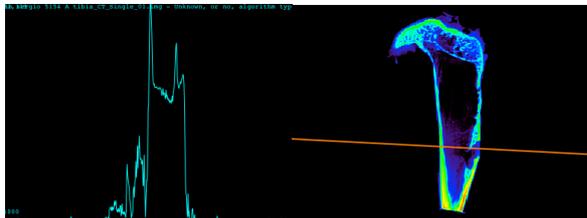
## 5154 Tibia derecha lecho inferior (Naringina)



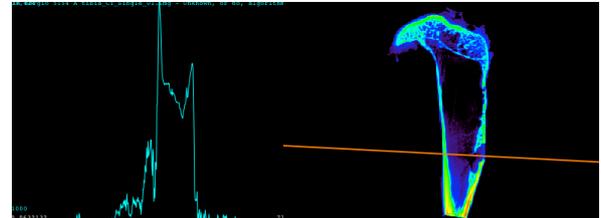
Línea 1



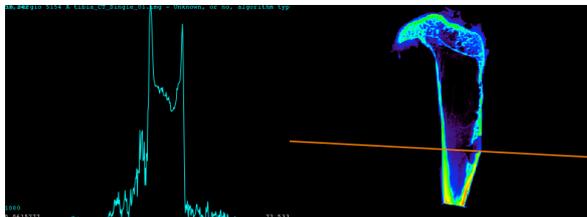
Línea 2



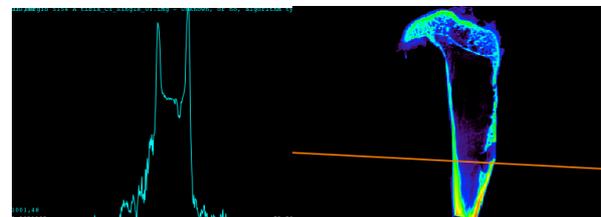
Línea 3



Línea 4



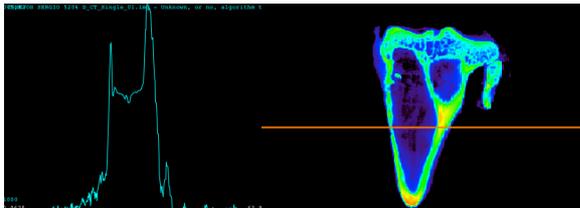
Línea 5



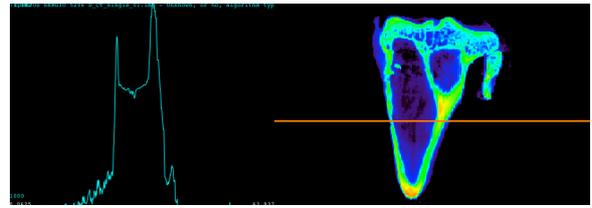
Línea 6

La línea 1 mostraba, tras un leve ascenso, una subida importante al comienzo de la franja y otra al final, siendo mayor la última. La líneas 2, 3, 4 y 5 mostraban una franja con una subida más grande al comienzo que al final. La línea 6 mostraban una subida importante al comienzo y otra mayor al final.

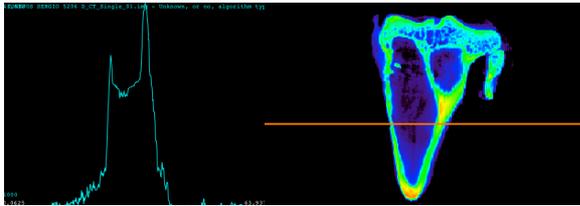
## 5206 Tibia derecha lecho inferior (Control)



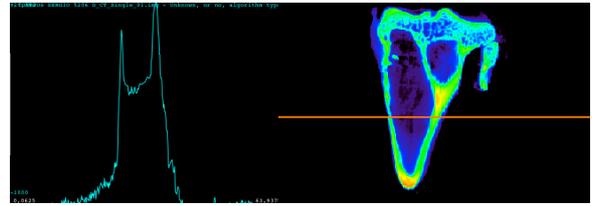
Línea 1



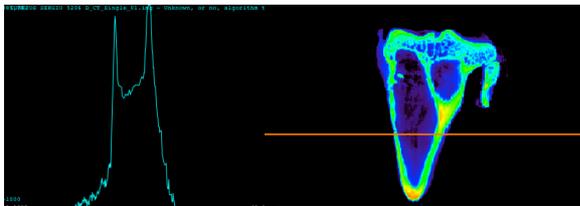
Línea 2



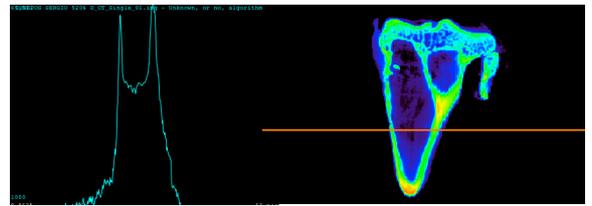
Línea 3



Línea 4



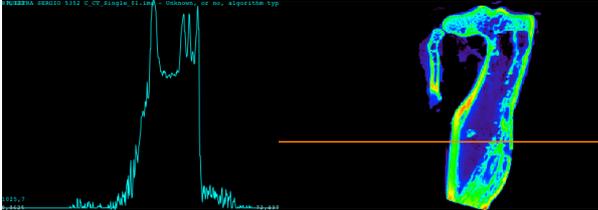
Línea 5



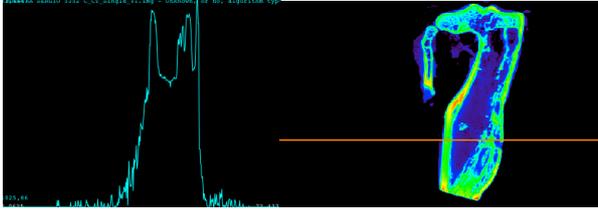
Línea 6

La línea 1 mostraba una franja con una subida destacable al comienzo y otra mayor al final, al igual que ocurría en las líneas 2 y 3. La línea 4 mostraba una subida mayor al comienzo que en las anteriores y al final también, la línea del comienzo aumentaba aún más en la línea 5 y se mantenía en la línea 6.

# 5352 Tibia derecha lecho inferior (Naringina)



Línea 1



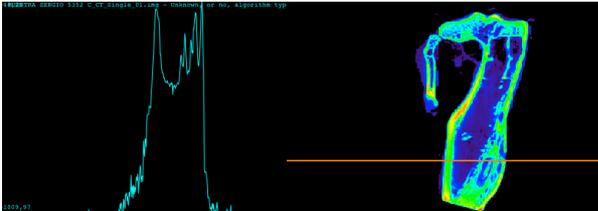
Línea 2



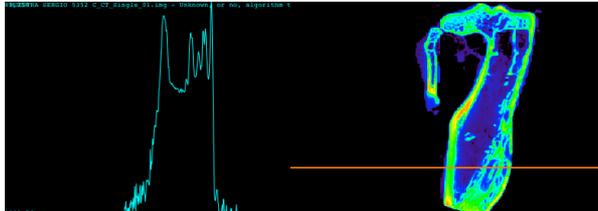
Línea 3



Línea 4



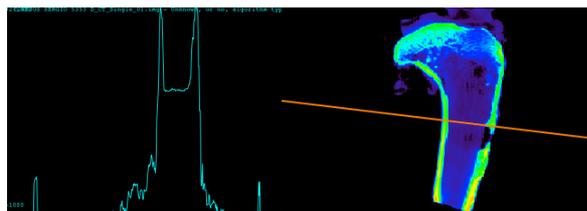
Línea 5



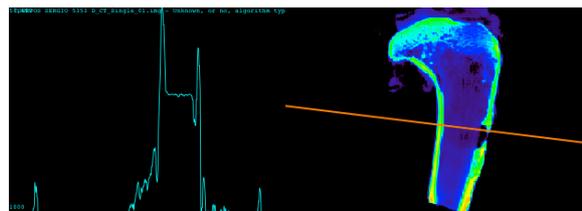
Línea 6

La línea 1 mostraba una franja con valores densitométricos altos, con una subida importante al comiendo, después se mantenía y volvía a subir varias veces, algo que ocurría de manera similar en todas las demás líneas.

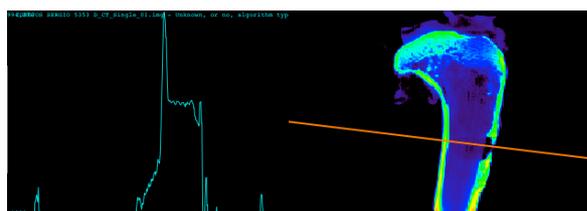
## 5353 Tibia derecha lecho inferior (Control)



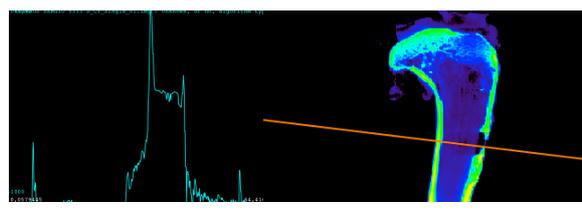
Línea 1



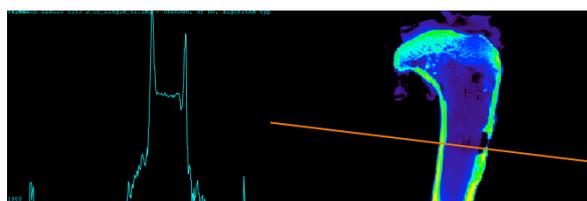
Línea 2



Línea 3



Línea 4



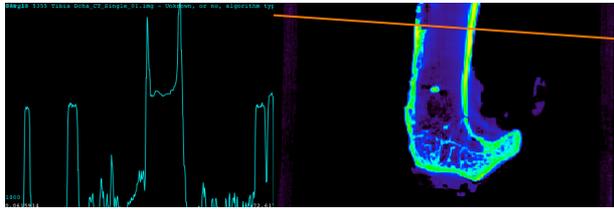
Línea 5



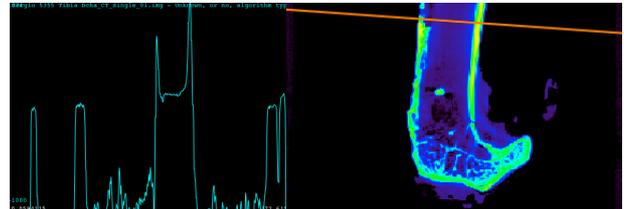
Línea 6

La línea 1 mostraba una franja definida con valores medios-altos, con una importante subida al comienzo y, después al final. La línea 2 presentaba el mismo patrón que el anterior pero la subida del final era más leve. La línea 3 presentaba una subida inicial importante, pero al final no existía subida, lo mismo ocurría en la línea 4. Las líneas 5 y 6 mostraban subidas importantes tanto al comienzo como al final.

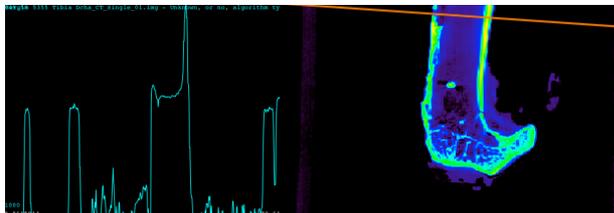
## 5355 Tibia derecha lecho inferior (Naringina)



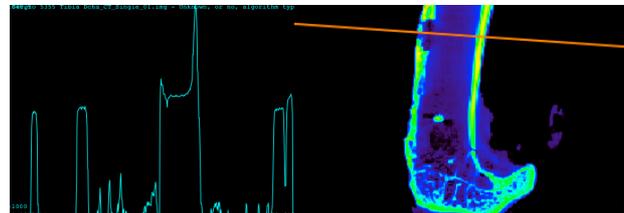
Línea 1



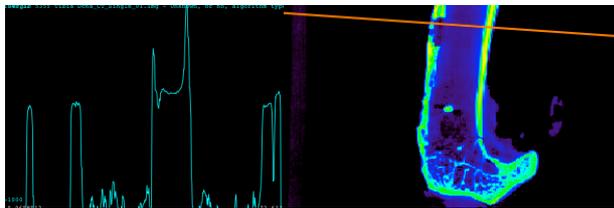
Línea 2



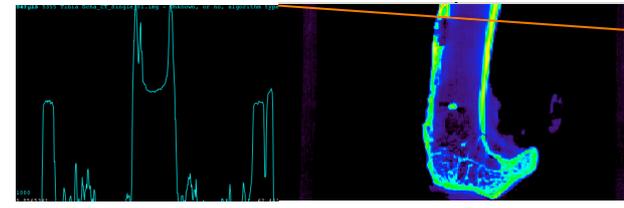
Línea 3



Línea 4



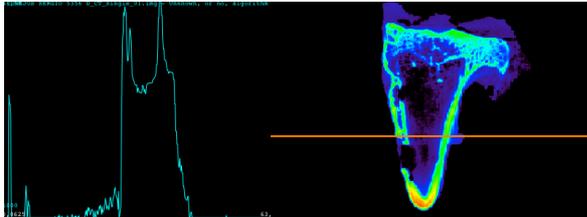
Línea 5



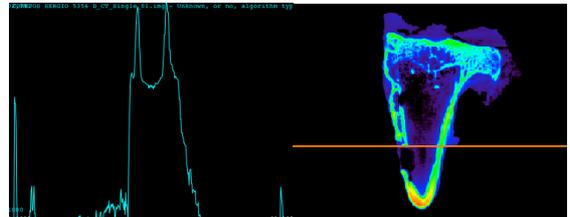
Línea 6

La línea 1 mostraba un patrón de subida y bajada puntual en algunos tramos, posteriormente mostraba una franja definida con subida al comienzo y al final para, posteriormente, seguir mostrando fluctuaciones irregulares a lo largo de la gráfica. En la línea 2 ocurría lo mismo. En las líneas 3 y 4 ocurría lo mismo si bien el pico de fuerte subida inicial no existía, pero sí al final de ese tramo. En la línea 5 las fluctuaciones eran similares y existía pico de subida tanto al comienzo como al final de ese tramo. El pico de subida, además, se disparaba en la línea 6.

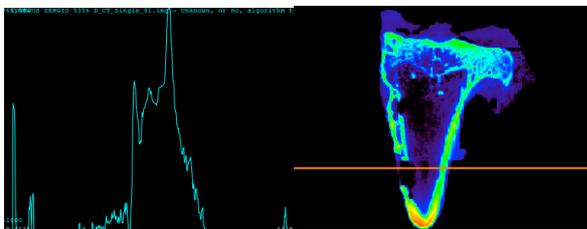
## 5356 Tibia derecha lecho inferior (Naringina)



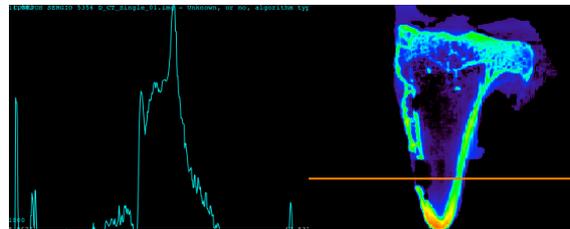
Línea 1



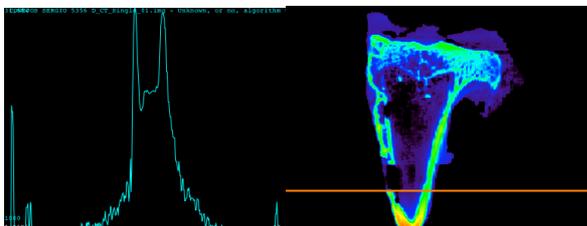
Línea 2



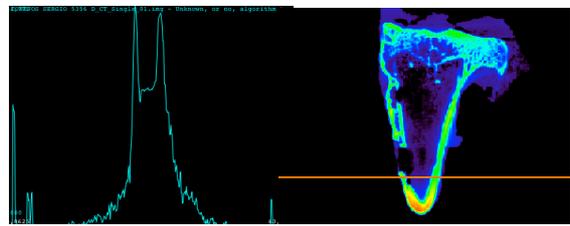
Línea 3



Línea 4



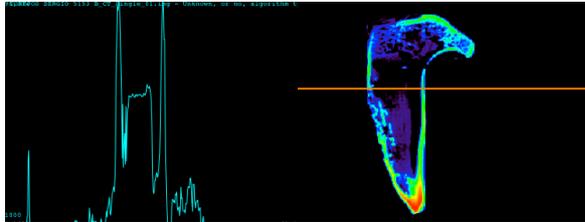
Línea 5



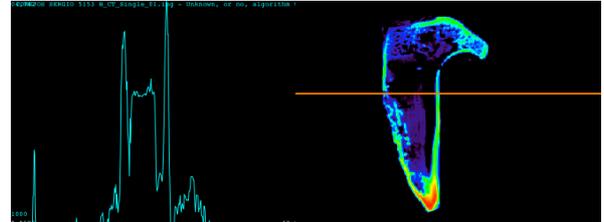
Línea 6

La línea 1 mostraba una franja con valores densitométricos altos, con una subida importante en el tramo inicial y otro en el tramo final, algo que ocurría de igual manera en la línea 2. La línea 3 la franja presentaba valores densitométrico más reducidos en general, mostrando una subida creciente pero sin subir de manera significativa, sólo al final subía de manera importante, lo mismo ocurría en la línea 4. La línea 5 mostraba una franja con una subida importante tanto al comienzo como al final, lo mismo ocurría en la línea 6.

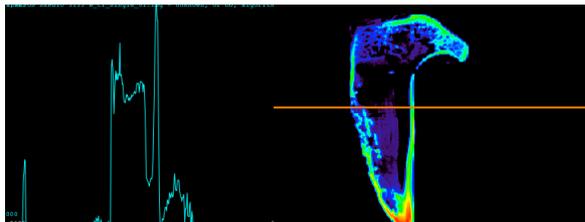
## 5153 Tibia izquierda lecho superior (Naringina+colágeno)



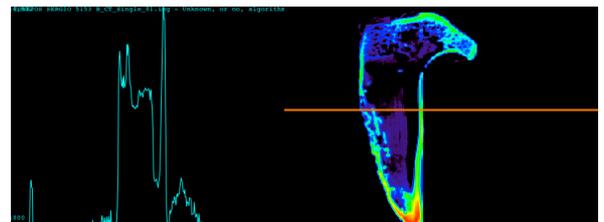
Línea 1



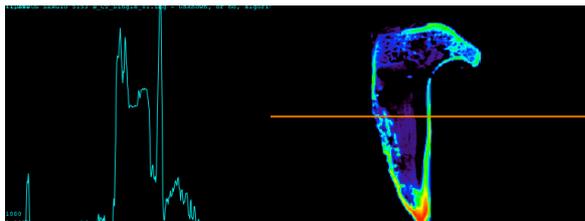
Línea 2



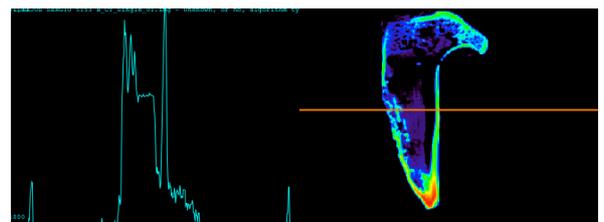
Línea 3



Línea 4



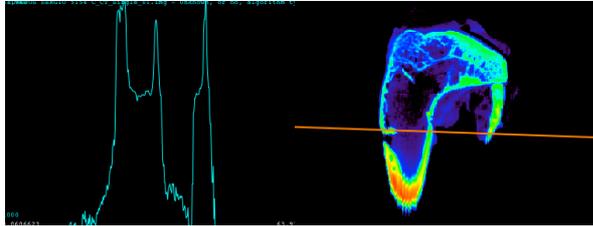
Línea 5



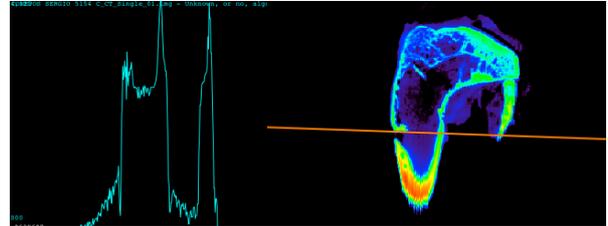
Línea 6

La línea 1 describía una subida leve al comienzo, seguida de una subida altísima y de forma abrupta, tras un pico de bajada, se mantenía estable, volvía a bajar y a subir, con grandes diferencias numéricas, finalmente decaía, la línea 2 tenía el mismo patrón, si bien la primera subida alta era menos acusada. Las líneas 3, 4, 5 y 6 mostraban patrones similares una subida llamativa desde el comienzo, se mantenía estable la franja con picos de subida al principio, después bajaba y subía hasta el máximo, finalmente decaía.

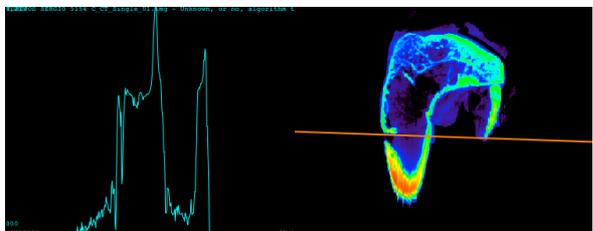
## 5154 Tibia izquierda lecho superior (Naringina+extracto de uva)



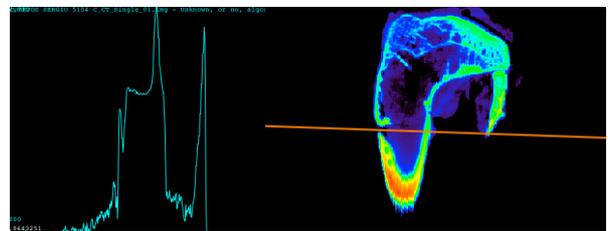
Línea 1



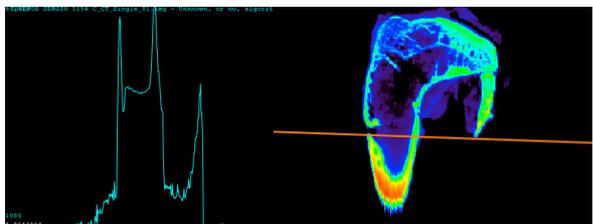
Línea 2



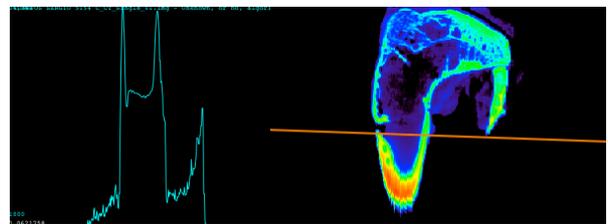
Línea 3



Línea 4



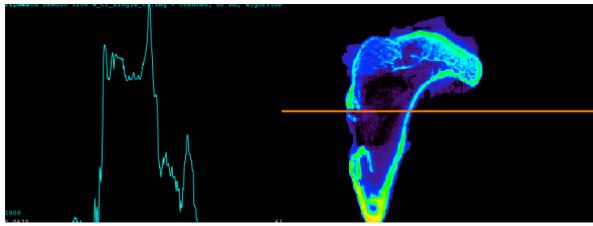
Línea 5



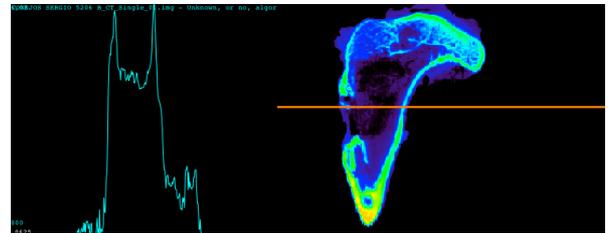
Línea 6

La línea 1 mostraba una subida primero breve y gradual, después subía hasta un máximo en términos densitométricos, después se mantenía estable tras decaer, subía un poco y bajaba súbitamente, en el tramo final se observaba una nueva subida y bajada, con una franja estable pero corta. Las líneas 2, 3 y 4 mostraban un patrón similar al anterior, si bien la primera subida no era tan alta, la 2 la franja final no mostraba un valor tan elevado y la 4 mostraba una franja final mucho más estrecha y fina. Las líneas 5 y 6 mostraban una subida gradual leve, luego subía mucho, bajaba, se mantenía estable, volvía a subir, decaía a un valor muy inferior para subir brevemente y decaer.

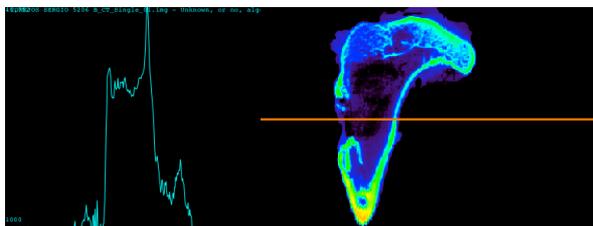
## 5206 Tibia izquierda lecho superior (Naringina+extracto de uva)



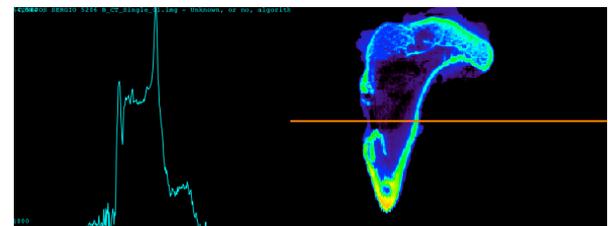
Línea 1



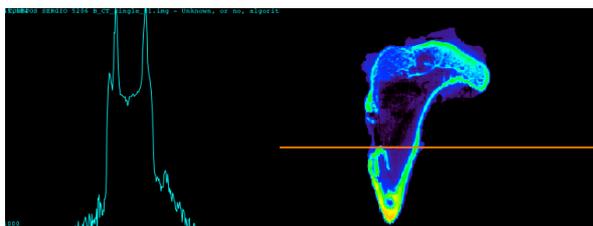
Línea 2



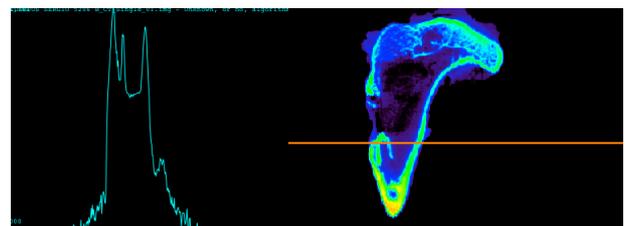
Línea 3



Línea 4



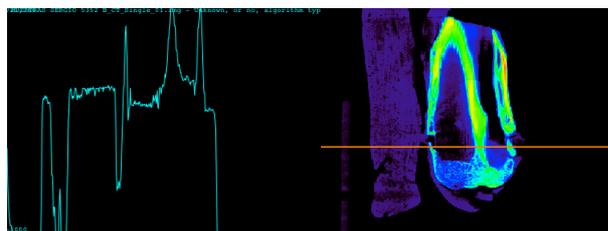
Línea 5



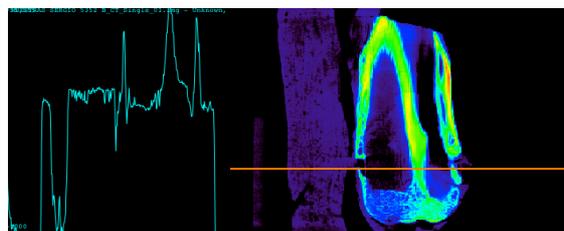
Línea 6

La línea 1 mostraba una subida súbita desde el comienzo, luego se mantenía estable con ligeros picos que subían, luego subían aún más hasta un máximo y a partir de ahí bajaba gradualmente, si bien en el tramo final volvía a subir levemente. La línea 2 mostraba una fuerte subida al comienzo, luego decaía y se estabilizaba, volvía a subir, decaer y mantenerse brevemente a niveles bajos. Las líneas 3 y 4 eran similares, subían al principio pero no a máximos, se mantenían estables, volvía a subir casi al final y decaía gradualmente. La línea 5 mostraba una franja con subida desde el principio y al final, con valores similares, la línea 6 también, pero habían picos de subida en medio de la franja.

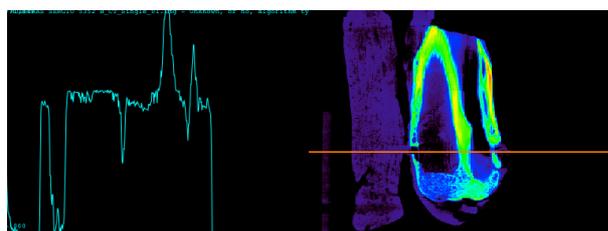
## 5352 Tibia izquierda lecho superior (Naringina+colágeno)



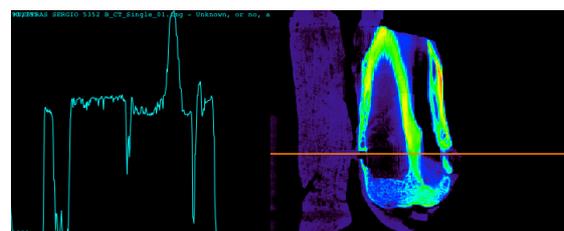
Línea 1



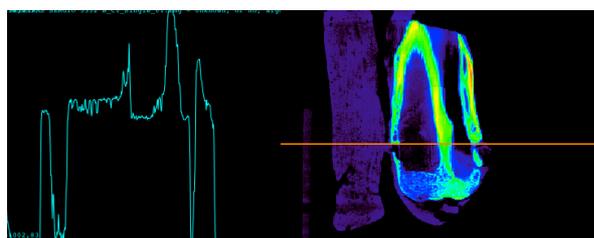
Línea 2



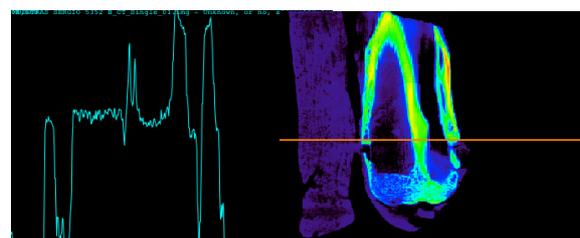
Línea 3



Línea 4



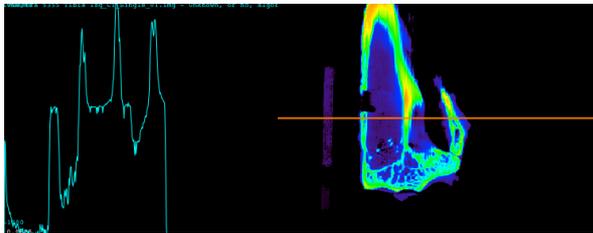
Línea 5



Línea 6

Las líneas 1 y 2 eran similares, mostraban un pico de subida, luego bajaba bruscamente, luego subía y se mantenía estable, tenía un pico de bajada, algo que no tenía la línea 2, luego tenía 2 picos de subida y bajaban. Las líneas 3 y 4 eran parecidas pero no iguales, subían, bajaban, volvían a subir y se mantenían estables, ambas mostraban un pico de bajada en la mitad de la franja, volvían a subir y, si bien la línea 3 mostraba un pico de subida antes de decaer, la línea 4 mostraba un pico de bajada antes de subir y decaer. Las líneas 5 y 6 eran parecidas, subían, se mantenían estables, luego volvían a subir y bajar, volvían a subir y luego decaían abruptamente para volver a subir y bajar, siempre con valores muy altos y llamativos, en términos densitométricos.

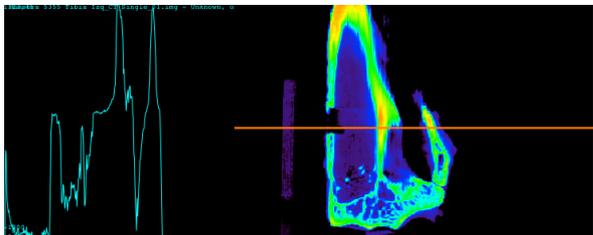
## 5355 Tibia izquierda lecho superior (Naringina+extracto de uva)



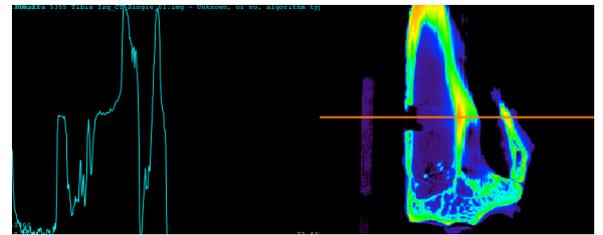
Línea 1



Línea 2



Línea 3



Línea 4



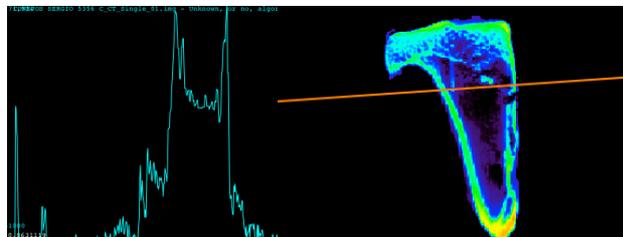
Línea 5



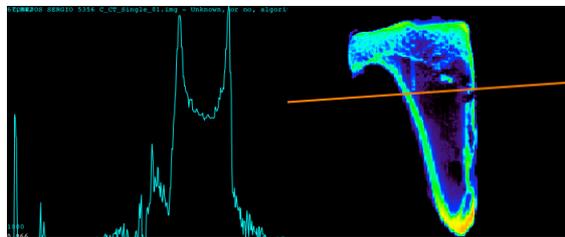
Línea 6

Las líneas 1 y 2 eran muy parecidas, subían, manteniendo una pequeña franja, bajaban, volvían a subir y bajar, así tres veces, hasta decaer abruptamente. Las líneas 3, 4, 5 y 6 eran muy parecidas, con unos picos de subida iniciales, hasta configurar una franja de valores medios-altos y más picos de subida, algo que pasaba más en la última línea. Luego decaía y volvía a subir y decaer.

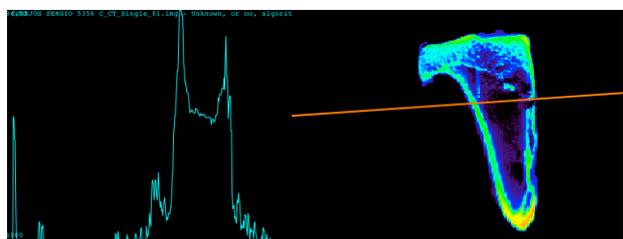
## 5356 Tibia izquierda lecho superior (Naringina+colágeno)



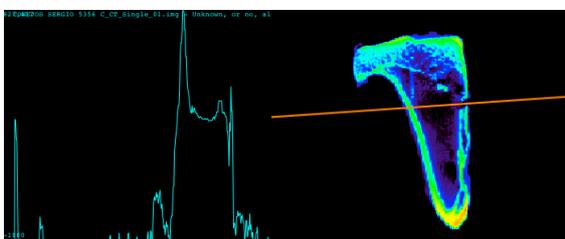
Línea 1



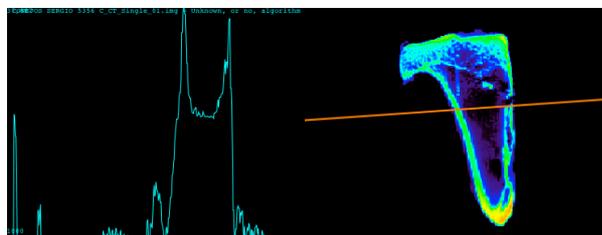
Línea 2



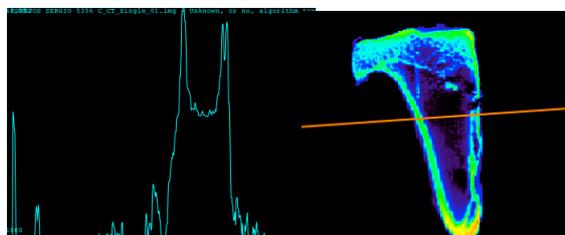
Línea 3



Línea 4



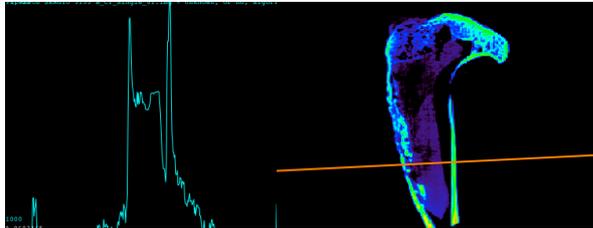
Línea 5



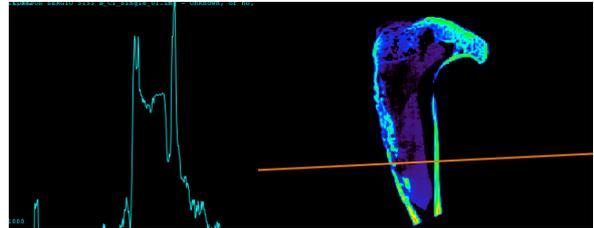
Línea 6

Las líneas 1, 2 y 3 mostraban, tras una breve subida inicial leve, una gran subida, después se mantenía en valores medios, luego volvía a subir (algo que se notaba menos en la línea 3) y, finalmente decaía. La línea 4 mostraba una subida similar pero apenas se apreciaba el segundo pico de subida en la franja que sí se apreciaban en las demás líneas. Las líneas 5 y 6 eran similares, tras una pequeña subida, mostraban 2 subidas más a lo largo de la franja, al principio y al final.

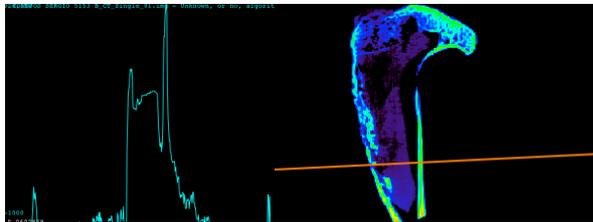
## 5153 Tibia izquierda lecho inferior (Naringina+colágeno)



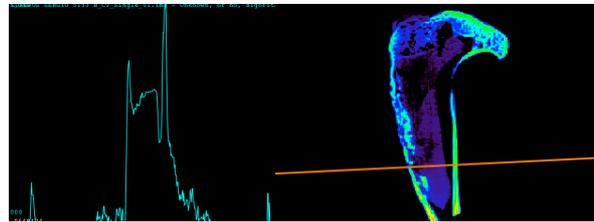
Línea 1



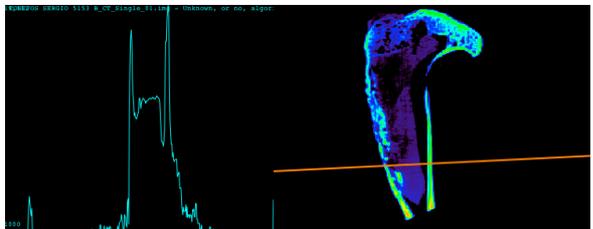
Línea 2



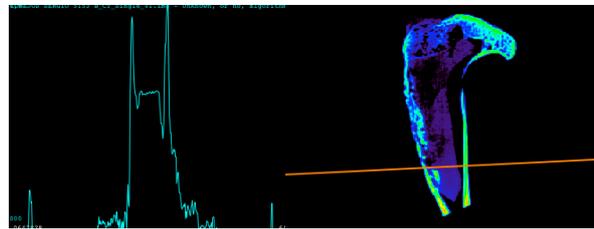
Línea 3



Línea 4



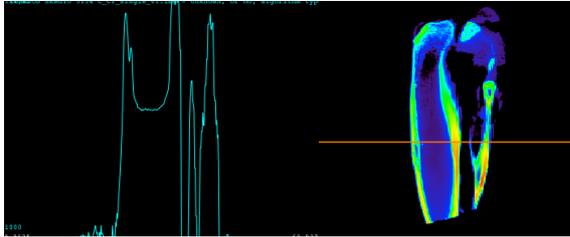
Línea 5



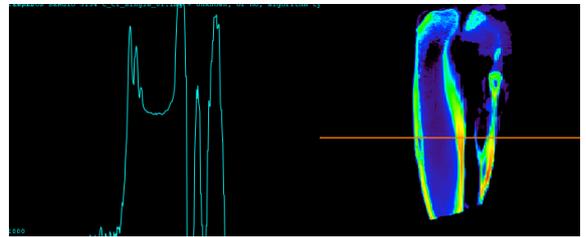
Línea 6

Las líneas 1, 2, 3 y 4 eran muy parecidas, tenían una subida importante, más en la 1 y 2, luego se mantenía a niveles medios y volvía a subir antes de decaer. Las líneas 5 y 6 presentaban una subida inicial mayor que la 3 y 4, por lo demás seguía un patrón muy parecido.

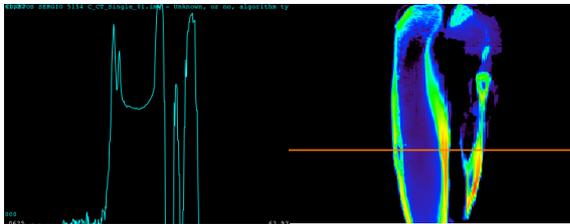
## 5154 Tibia izquierda lecho inferior (Naringina+extracto de uva)



Línea 1



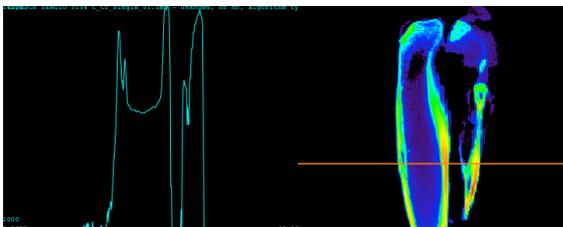
Línea 2



Línea 3



Línea 4



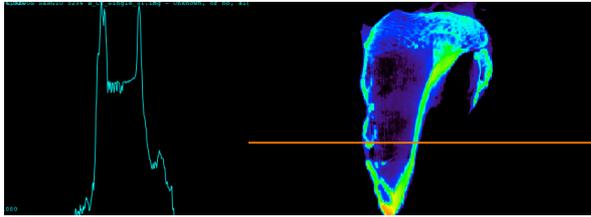
Línea 5



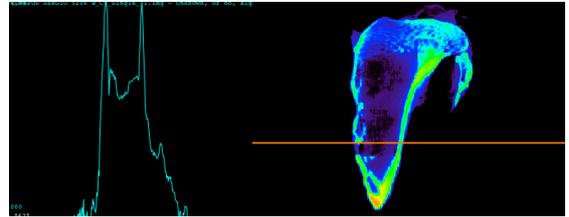
Línea 6

Las líneas 1, 2, 3 y 4 eran muy parecidas, tras subir mucho inicialmente, decaían a nivel medio, se mantenía, volvía a subir a niveles máximos y luego presentaba dos picos de subidas importantes y bajadas, hasta desaparecer. Las líneas 5 y 6 mostraban, aparte de las características anteriores, una franja pequeña al final, estable, en vez de varios picos.

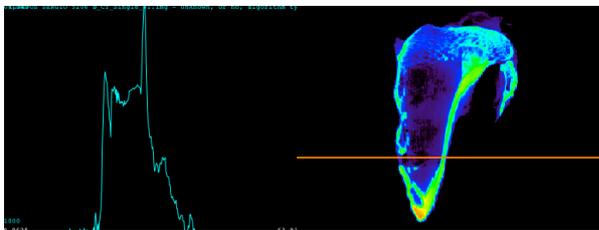
## 5206 Tibia izquierda lecho inferior (Naringina+colágeno)



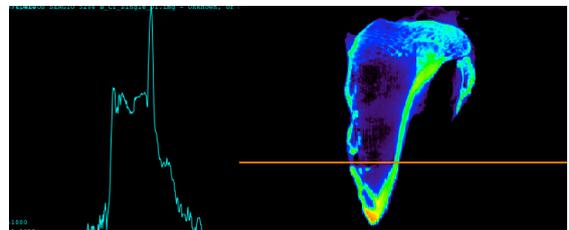
Línea 1



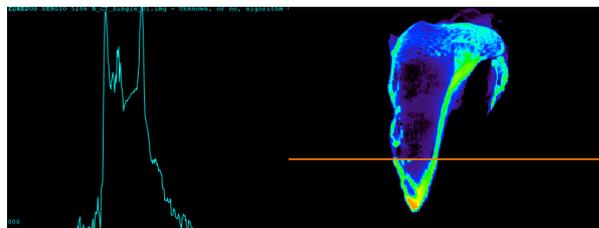
Línea 2



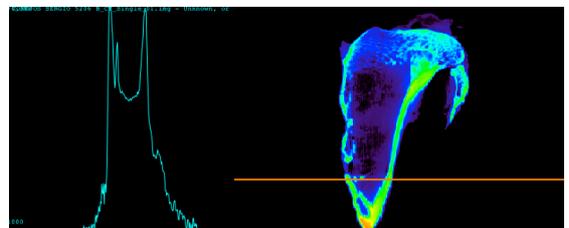
Línea 3



Línea 4



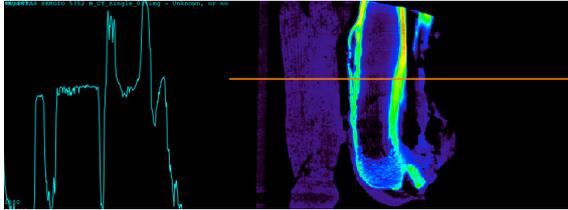
Línea 5



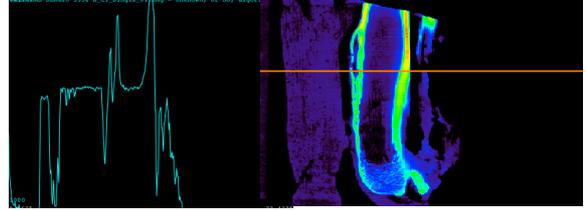
Línea 6

Las líneas 1 y 2 compartían una franja con subida inicial, luego baja y se consolidaba a niveles medios, volvía a subir para finalmente desaparecer. Las líneas 3 y 4 mostraban la misma franja pero sin la fuerte subida inicial, algo que volvía a aparecer en las líneas 5 y 6, con presencia, además, de pequeños picos en medio de la franja.

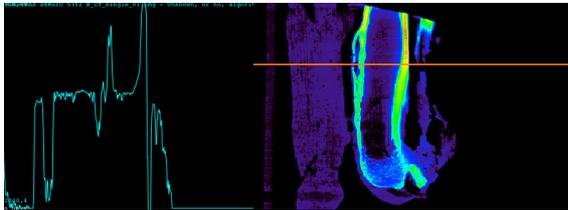
## 5352 Tibia izquierda lecho inferior (Naringina+extracto de uva)



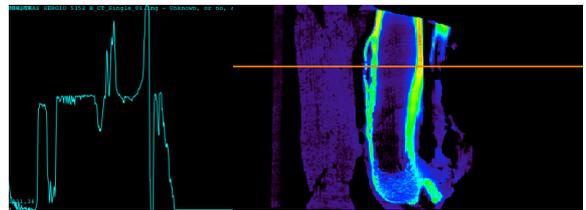
Línea 1



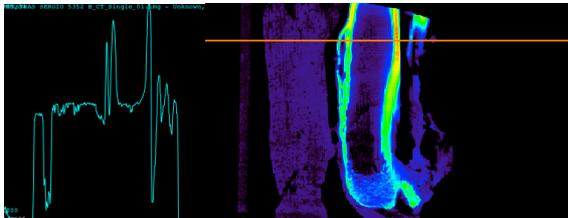
Línea 2



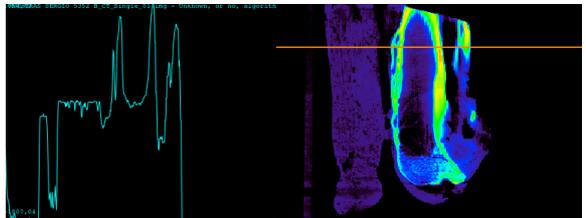
Línea 3



Línea 4



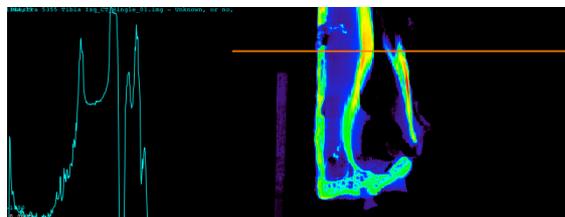
Línea 5



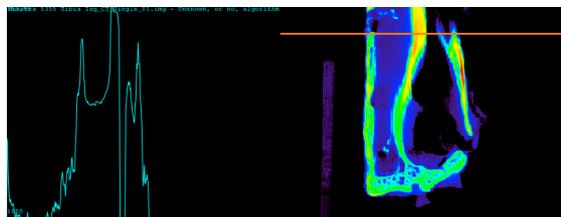
Línea 6

La línea 1 mostraba una pequeña franja de subida y bajada, seguida de una subida a niveles medios, luego se mantenía, descendía abruptamente en la mitad de la gráfica, algo que no sucedía en las demás líneas, luego subía y bajaba. La línea 2 el descenso que ocurre en la mitad de la gráfica era menor, algo que se contrastaba también en la líneas 3 y 4, en las líneas 5 y 6 no había tal descenso en la zona media.

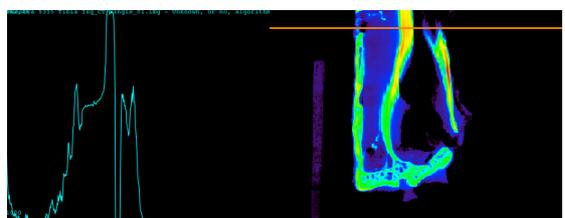
## 5355 Tibia izquierda lecho inferior (Naringina+colágeno)



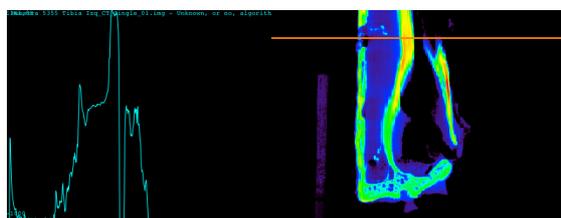
Línea 1



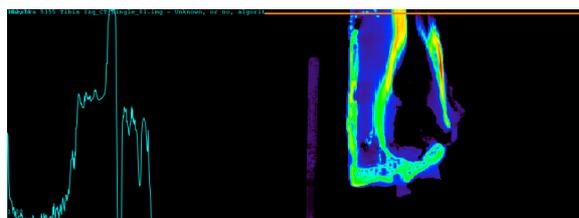
Línea 2



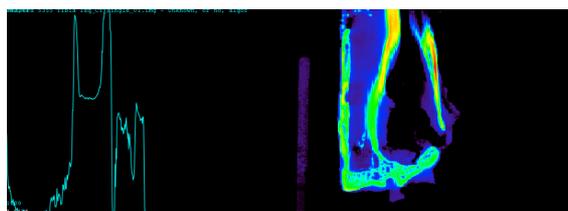
Línea 3



Línea 4



Línea 5



Línea 6

La línea 1 mostraba una fuerte subida, luego decaía y se mantenía, luego volvía a subir y bajar a niveles máximos y mínimos, formando una franja estrecha al final, algo que ocurría también en la línea 2. En las líneas 3, 4 y 5 ocurría lo mismo pero la franja final mostraba valores inferiores a nivel de densidad. La línea 6 mostraba una subida al comienzo y final de la franja grande, luego aparecía otra pequeña con pequeñas subidas y bajadas, por debajo de los valores medios.

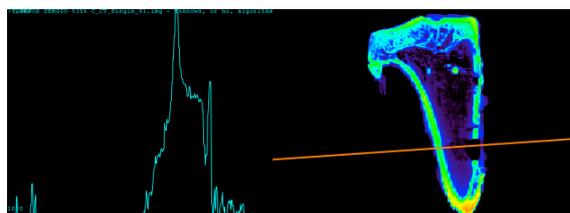
## 5356 Tibia izquierda lecho inferior (Naringina+extracto de uva)



Línea 1



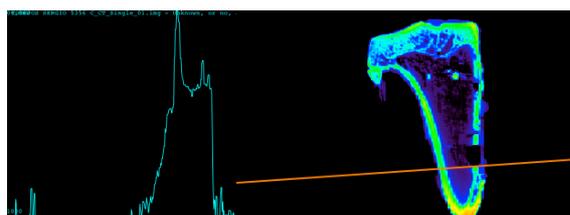
Línea 2



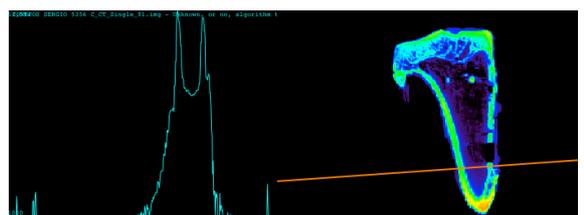
Línea 3



Línea 4



Línea 5



Línea 6

La línea 1 mostraba una subida tanto al principio como final de la franja, luego decaía. La línea 2 también mostraba ambos picos, si bien el pico del final de esta franja principal era más leve. La línea 3 mostraba un pico que alcanzaba niveles máximos al comienzo de la franja, luego decaía hasta niveles altos para bajar y subir nuevamente de forma breve, antes de desaparecer, algo que ocurría también en la línea 4. La línea 5 mostraba una franja que subía al comienzo, se mantenía en términos medios y decaía. La línea 6 presentaba, aparte de la subida inicial, otro pico de subida antes de decaer, al final de la franja.

## **Interpretación de las gráficas, grupos control, concordancia y correlación anatómica**

Un hecho llamativo del análisis de los lechos control es la coherencia que muestra la cortical contralateral al defecto de manera unánime. Se evidencia un pico más elevado en esta zona respecto a la zona del defecto, atribuible en este último caso a la discontinuidad de la cortical, producto del paso de la trefina.

También se observaba de manera coincidente, tras visualizar los gráficos, que la mandíbula es más densa que el maxilar. Asimismo, se evidencia una llamativa subida en valores de densidad en la zona del incisivo contralateral, en las muestras correspondientes a maxilar y mandíbula.

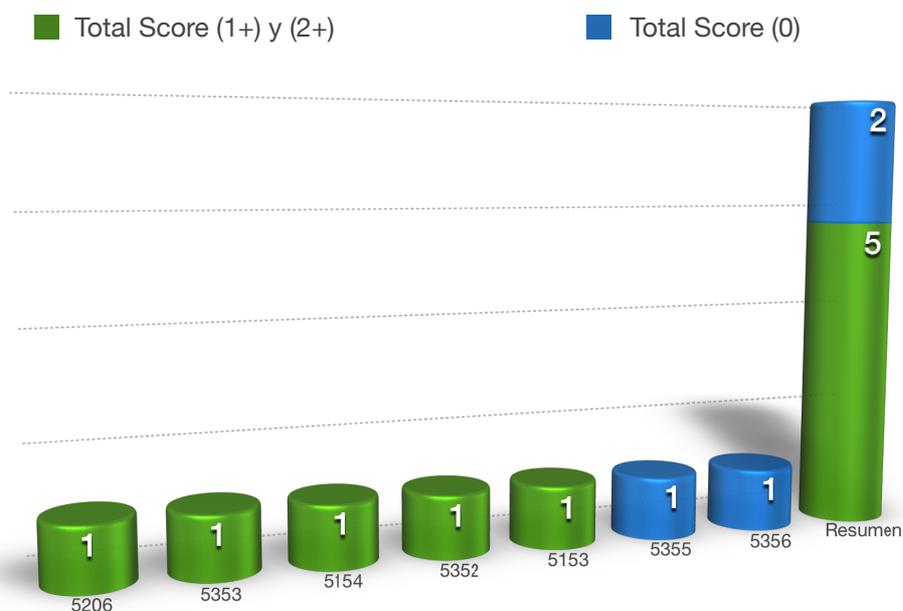
A la hora de evaluar las gráficas de los lechos control se observaba que de los 7 lechos del grupo control, tres, concretamente, de los conejos 5153, 5154 y 5352, la curva indicaba un valor bajo al inicio del defecto y luego subía ligeramente. Los otros cuatro, correspondientes a los sujetos 5352, 5355, 5206 y 5356, tenían un valor en la zona del defecto ligeramente elevado en la zona del defecto.

A continuación, mostraremos las gráficas y tablas con el score de cada muestra. Recordemos que **(0)** significa zona de baja densidad o similar al resto de las regiones, **(1+)**, que existen indicios suficientes que indiquen valores numéricos más altos y/o estabilidad en la franja de este tramo, respecto a la zona vecina en el caso de las tibias y contralateral en el caso de maxilar y mandíbula, **(2+)**, que existen indicios claros que indican valores numéricos más altos y/o estabilidad en la franja de este tramo, respecto a la zona vecina en el caso de las tibias y contralateral en el caso de maxilar y mandíbula.

## Tablas y gráficas de los lechos que contienen naringina

Score naringina (Tabla 7)

N° Conejo	Localización del defecto	Tratamiento	Puntuación (score)	Total Score (0)	Total Score (1+) y (2+)
5206	Tibia derecha lecho superior	Naringina	(1+)		1
5353	Tibia derecha lecho superior	Naringina	(2+)		1
5154	Tibia derecha lecho inferior	Naringina	(2+)		1
5352	Tibia derecha lecho inferior	Naringina	(2+)		1
5153	Tibia derecha lecho inferior	Naringina	(1+)		1
5355	Tibia derecha lecho inferior	Naringina	0	1	
5356	Tibia derecha lecho inferior	Naringina	0	1	
<b>Resumen</b>				<b>2</b>	<b>5</b>



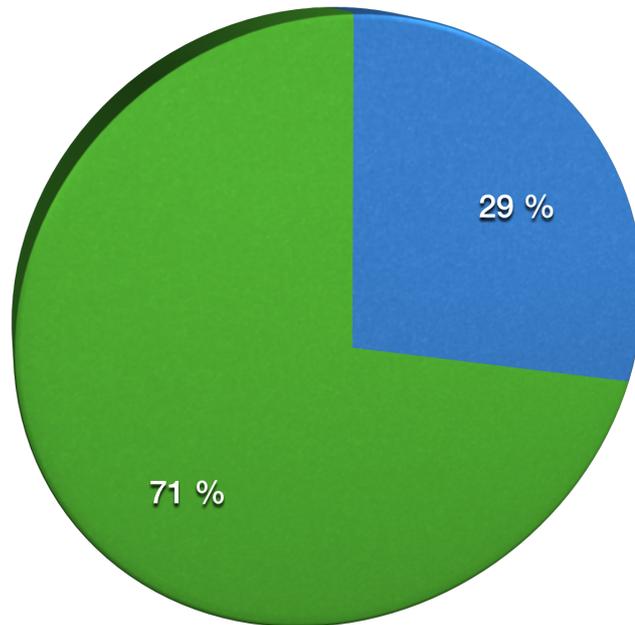
Resumen naringina

5 score positivos (2 de 1+ y 3 de 2+)

2 score (0)

**Score naringina (en %)**

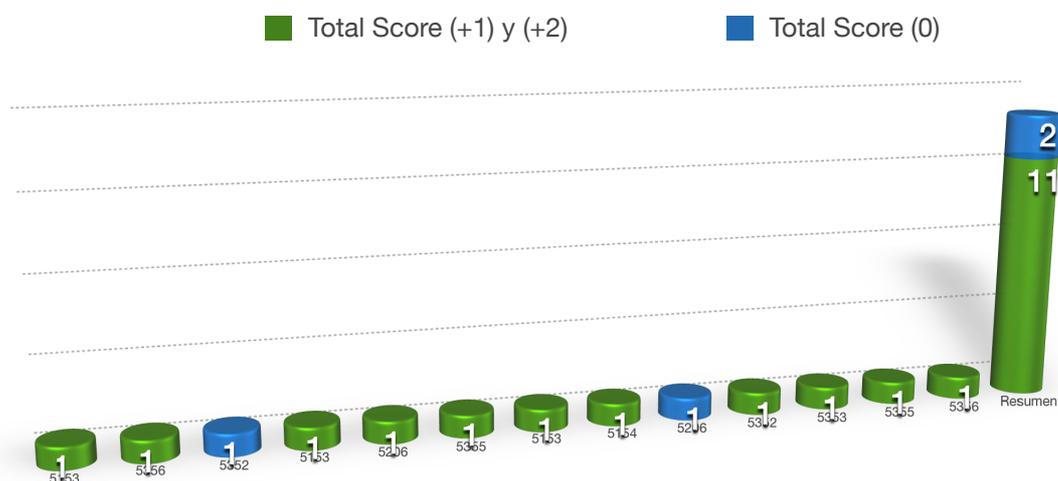
● Total Score naringina (0)      ● Total Score naringina (1+) y (2+)



## Tablas y gráficas de los lechos que contienen naringina+colágeno

Score naringina+colágeno (Tabla 8)

Nº Muestra	Localización del defecto	Tratamiento	Puntuación (score)	Total Score (0)	Total Score (1+) y (2+)
5153	Tibia izquierda lecho superior	Naringina +colágeno	(2+)		1
5356	Tibia izquierda lecho superior	Naringina +colágeno	(2+)		1
5352	Tibia izquierda lecho superior	Naringina +colágeno	0	1	
5153	Tibia izquierda lecho inferior	Naringina +colágeno	(2+)		1
5206	Tibia izquierda lecho inferior	Naringina +colágeno	(1+)		1
5355	Tibia izquierda lecho inferior	Naringina +colágeno	(1+)		1
5153	Maxilar	Naringina +colágeno	(1+)		1
5154	Maxilar	Naringina +colágeno	(2+)		1
5206	Maxilar	Naringina +colágeno	0	1	
5352	Maxilar	Naringina +colágeno	(1+)		1
5353	Maxilar	Naringina +colágeno	(1+)		1
5355	Maxilar	Naringina +colágeno	(1+)		1
5356	Maxilar	Naringina +colágeno	(1+)		1
<b>Resumen</b>				<b>2</b>	<b>11</b>



Resumen naringina+colágeno (tibias)

5 score positivos (2 de 1+ y 3 de 2+)

1 score (0)

Resumen naringina+colágeno (maxilar)

6 score positivos (5 de 1+ y 1 de 2++)

1 score (0)

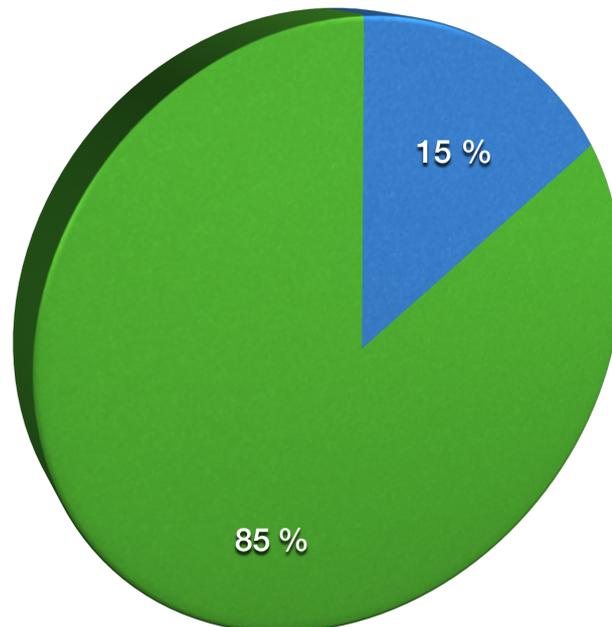
Resumen naringina+colágeno (global)

11 score positivos (7 de 1+ y 4 de 2++)

2 score (0)

**Score naringina+colágeno (en %)**

● Total Score (0)      ● Total Score (+1) y (+2)



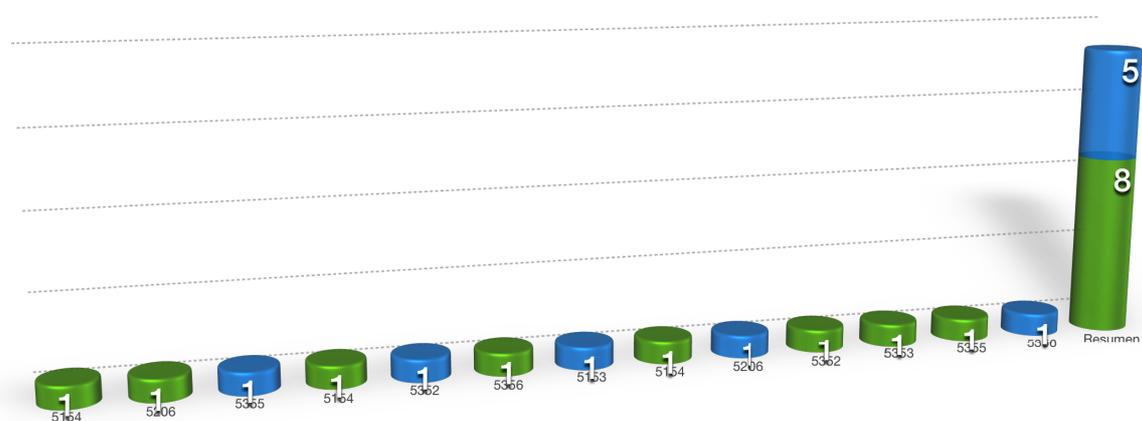
## Tablas y gráficas de los lechos que contienen naringina+extracto de uva

Score naringina+extracto de uva (Tabla 9)

Nº Muestra	Localización del defecto	Tratamiento	Puntuación (score)	Total Score (0)	Total Score (1+) y (2+)
5154	Tibia izquierda lecho superior	Naringina+Uva	(1+)		1
5206	Tibia izquierda lecho superior	Naringina+Uva	(1+)		1
5355	Tibia izquierda lecho superior	Naringina+Uva	0	1	
5154	Tibia izquierda lecho inferior	Naringina+Uva	(2+)		1
5352	Tibia izquierda lecho inferior	Naringina+Uva	0	1	
5356	Tibia izquierda lecho inferior	Naringina+Uva	(1+)		1
5153	Mandíbula	Naringina+Uva	0	1	
5154	Mandíbula	Naringina+Uva	(2+)		1
5206	Mandíbula	Naringina+Uva	0	1	
5352	Mandíbula	Naringina+Uva	(1+)		1
5353	Mandíbula	Naringina+Uva	(1+)		1
5355	Mandíbula	Naringina+Uva	(1+)		1
5356	Mandíbula	Naringina+Uva	0	1	
<b>Resumen</b>				<b>5</b>	<b>8</b>

■ Total Score (+1) y (+2)

■ Total Score (0)



Resumen naringina+extracto de uva (tibias)

4 score positivos (3 de 1+ y 1 de 2+)

2 score (0)

Resumen naringina+extracto de uva (mandíbula)

4 score positivos (3 de 1+ y 1 de 2+)

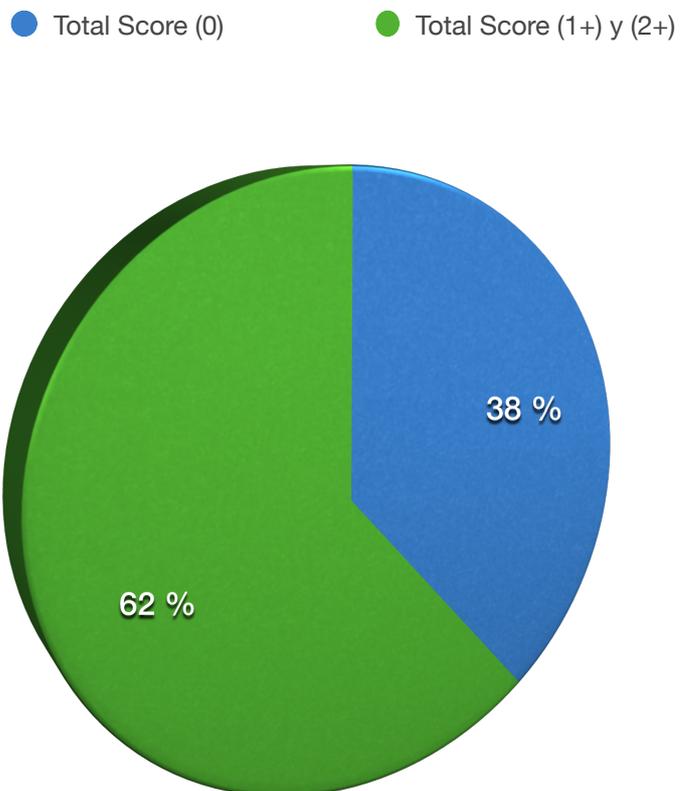
3 score (0)

Resumen naringina+extracto de uva (global)

8 score positivos (6 de 1+ y 2 de 2+)

5 score (0)

**Score naringina+extracto de uva (en %)**



## Resumen global de todas las zonas de experimentación

### Resumen naringina

5 score positivos (2 de 1+ y 3 de 2+).

2 score (0)

### Resumen naringina+colágeno (global)

11 score positivos (7 de 1+ y 4 de 2++)

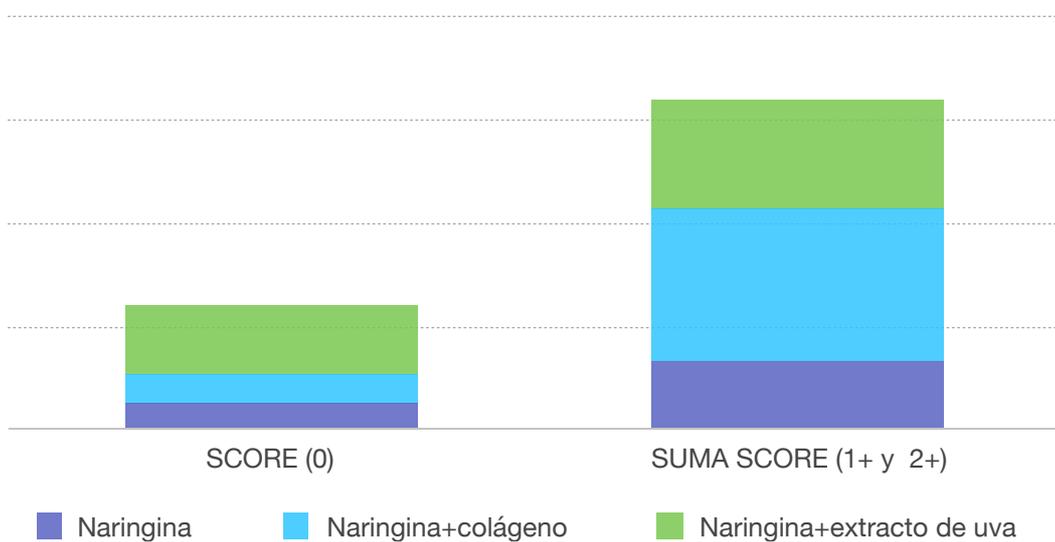
2 score (0)

### Resumen naringina+extracto de uva (global)

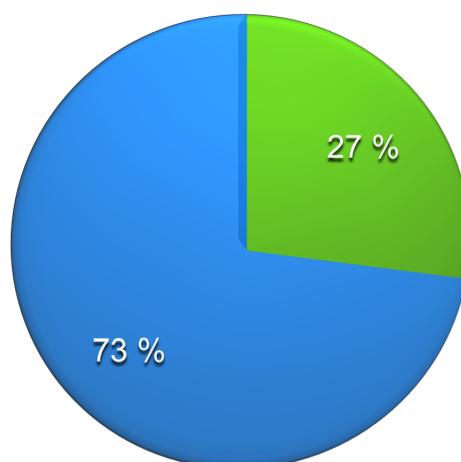
8 score positivos (6 de 1+ y 2 de 2+)

5 score (0)

## COMPARATIVA POR BIOMATERIALES DE SCORE (0) Y (1+ y 2+)



COMPARATIVA GLOBAL, 73%  
SCORE (1+ Y 2+), 27%  
SCORE (0)





## **V DISCUSIÓN**



Existe un impacto directo de la pérdida dentaria en la calidad de vida al afectar a la función masticatoria, habla y, en algunos casos, socialización (Gerritsen et al., 2010). Esto ocurre por diferentes patologías (quísticas, tumorales o traumáticas) (Martínez y Ozols, 2012) o situaciones que pueden hacer necesario este procedimiento: caries avanzadas, traumatismos, lesiones endodónticas, defectos del desarrollo o periodontitis avanzadas.

Cuando se produce la pérdida de la pieza o piezas dentarias, se plantean básicamente varias opciones para rehabilitar funcional y estéticamente la ausencia de las mismas. Una de ellas es una **prótesis dental removible**, sea parcial o total. Como ventajas de ella destacamos la higiene, la sustitución de tejido blando en las zonas estéticas y su coste reducido. Sin embargo, como desventaja cabe señalar que, en muchas ocasiones no dan la retención y estabilidad deseada, lo que puede sugerir una deficiencia en la efectividad funcional de la prótesis en comparación a una dentadura natural, sumado a la pérdida ósea que su uso conlleva. Según Matuz, su eficiencia masticatoria no es mayor al 30% de una dentadura natural. Sin embargo, en caso de ausencia de hueso y si fuera imposible la colocación de implantes, sí que podría ser una buena opción.

Otra opción para reponer piezas dentarias perdidas es la **prótesis parcial fija dento-soportada**, con una tasa de supervivencia cercana al 90% a 10 años y 74% a 15 años. Como ventajas de la prótesis parcial fija destacamos que no depende del hueso y tejidos blandos, produce menos miedo al paciente y supone poco tiempo (con pocas citas y poco tiempo de separación entre ellas). El problema de la prótesis parcial fija dento-soportada es el tallado de los dientes que sirven como pilar, con su correspondiente riesgo biológico y mecánico, ambos irreversibles. El motivo más frecuente de complicación irreversible es la caries (82,2%), seguida de la pérdida de retención (15,3%). Sin embargo, sí podría estar indicada esta opción en algunos casos, como en el caso de dientes posteriores endodonciados o con restauraciones dentarias muy extensas, aquí las preparaciones dentarias y su correspondiente restauración protésica pueden ser un medio para mejorar la resistencia y estructura anatómica. Otra indicación puede ser aquellos dientes anexos a brechas edéntulas que presentan, asimismo, alteraciones de planos oclusales. Los condicionantes médicos, quirúrgicos, psicológicos, económicos e incluso estéticos, por ejemplo, cuando se quiere aprovechar los dientes vecinos de un sector edéntulo anterosuperior para realizar un cambio estético por cuanto a forma o color se refiere, por ejemplo, pueden ser otra indicación para emplear prótesis fija dento-soportada.

Los **implantes dentales** proporcionan tanto al dentista como al paciente una opción de tratamiento alternativa a la prótesis fija o removible para sustituir las piezas dentarias perdidas, siendo la mejor opción para reponer la estética y función perdida (Misch, 2009) siempre y cuando haya volumen óseo tanto en sentido vertical como horizontal, requisito imprescindible para obtener oseointegración en los implantes dentales (Nart et al., 2007). Los implantes evitan la preparación de los dientes adyacentes (a menudo intactos), reduciendo el riesgo de sensibilidad en los dientes preparados, además del beneficio estético (diente natural frente a corona estética de los dientes preparados) y, lo más importante, el implante mantiene el hueso en su sitio.

Los implantes tienen un gran nivel de satisfacción en los pacientes, tanto en los aspectos funcionales como estéticos, (Sánchez et al., 2013). Existe un éxito en implantes endoóseos en pacientes parcial o totalmente edéntulos, tanto maxilar o mandíbula superior al 90% (AAP, 2000). Por este motivo, son la mejor opción para reponer las piezas perdidas frente a otras (prótesis removible o puente) (Misch, 2009).

Sin embargo, en caso de deficiencia ósea la colocación de los implantes puede ser imposible. Los injertos óseos se aplican tanto para la reconstrucción de un reborde alveolar inadecuado tras la pérdida ósea como para la preservación de los alveolos, ya que conserva de mejor manera las dimensiones del reborde residual al compararla con el proceso de cicatrización fisiológica del alveolo sin la utilización de biomateriales (Darby et al., 2009), dada la remodelación ósea significativa que se da tras una extracción dental.

El propósito principal de este estudio experimental ha consistido en calibrar y comprender, mediante respuestas racionales y objetivas, la efectividad de los procedimientos quirúrgicos que aplicamos y los resultados en nuestros animales, en este caso, conejos albinos de Nueva Zelanda, con el fin de valorar su extrapolación a seres humanos en futuros ensayos clínicos, enmarcándose nuestro trabajo dentro de las actuales investigaciones y tendencias en el campo de la implantología oral. Hemos basado nuestro estudio en el análisis óseo por medio de TC y HU, de una manera no invasiva, para valorar la densidad que existe tras la colocación de un biomaterial.

Debemos tener en cuenta la irreversibilidad del proceso de reducción de volumen óseo tras la pérdida de la pieza dental, tanto en sentido horizontal como vertical, que es mayor en el maxilar superior que en la mandíbula y en vestibular que en palatino (Nart et al., 2007), y que repercute de manera directa en el lecho donde se aloja el implante (Avila-Ortiz et al., 2014). Y, si bien el hueso es un tejido con capacidad de regeneración tras sufrir un daño, mediante mecanismos osteoformadores, cuando hay pérdidas considerables de tejido óseo no puede realizar con éxito la restitución de la integridad del tejido, siendo necesario recurrir al aporte de sustitutivos óseos para obtener la reparación.

Y es que para que el implante sea un éxito tras su colocación tiene que haber un volumen óseo suficiente en altura, anchura y una **densidad ósea adecuada**, para que dé lugar a la osteointegración, que es la unión directa entre el hueso y el metal, sin interposición de tejido no óseo (Mavrogenis et al., 2009) o “La conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie del implante sometido a carga funcional” (Branemark et al., 1999) con una serie de reacciones a nivel celular y extracelular, con procesos osteogénicos similares a los que ocurren en la reparación de hueso (Vagaská et al., 2010). Por otra parte, el hueso humano a partir de los 40 años, pierde densidad debido a un desajuste en el proceso de remodelado óseo. La pérdida de densidad se presenta como un adelgazamiento de la estructura trabecular, la cual amplía los espacios inter-trabeculares (Flores y Ayala, 2012).

Existen trabajos de investigación desarrollados para minimizar la pérdida ósea post-extracción, donde al cabo de 6 semanas se ha producido el cubrimiento completo del alveolo por hueso trabecular (Monje et al., 2007). De hecho, se han propuesto, gracias a investigaciones hechas tanto in vivo como in vitro durante las últimas 2 décadas, numerosas técnicas de aumento de tejido (duros y blandos), así como los enfoques de conservación cresta (McAllister y Haghghat, 2007), incluyendo el uso de diversos biomateriales (injertos óseos, esponjas de colágeno, factores de crecimiento y membranas) e incluso células madre, destacando los estudios de de Mankani en el 2001, que muestran la efectividad de las células madre en reparación ósea en modelos animales, donde las células madre son reproducidas en laboratorio, cargadas y transplantadas localmente al sitio del defecto óseo. Si bien los resultados indican una disminución de reabsorción ósea respecto al grupo control, la reabsorción es inevitable (Salgado et al., 2014), aún así, se considera imprescindible la preservación del alveolo en zonas estéticas, siendo el material más indicado los xenoinjertos (Saletta et al., 2014).

Hoy en día, el mejor sustitutivo óseo es el denominado autoinjerto óseo o hueso autólogo o “gold standard” en cirugía ósea reconstructiva, debido a que hay menos riesgo de rechazo del injerto, ya que el mismo se originó en el propio cuerpo del paciente (Gómez, 2013), siendo el único biomaterial que tiene capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora, además, evita la transmisión de enfermedades y el rechazo inmunitario. Sin embargo, como puntos negativos destacamos la morbilidad de la zona dadora, la insuficiente cantidad de injerto (Martínez y Ozols, 2012) y la gran reabsorción y además, impredecible, con un alrededor del 60% de pérdida en injertos en bloque córtico-esponjoso (Gómez et al., 2013). Desde hace décadas existen numerosas investigaciones en el campo de ingeniería de tejidos, habiéndose caracterizado diversos biomateriales (materiales, elementos, sustancias o compuestos, elaborados con componentes naturales o artificiales) que pueden tener utilidad para facilitar la regeneración ósea, capaces de implantarse en un organismo vivo para reemplazar o reparar un tejido natural lesionado o irreversiblemente dañado, ya que mimetizan la arquitectura, composición y/o funcionamiento del tejido original, sin embargo, los mismos presentan carencias siendo un pro-

blema pendiente de resolver en la actualidad la sustitución del hueso, existiendo en la actualidad la necesidad de buscar nuevos biomateriales.

Debido a que en implantología uno de los factores de osteointegración y éxito más importantes es la densidad ósea, sería prometedor poder evaluar este parámetro de manera no invasiva. Se acusa su importancia tanto antes de la cirugía implantológica, para calibrar la dificultad o valorar qué técnica implantológica debería ser aplicada, en función de la densidad ósea (según Clasificación de Norton y Gamble), como después, para valorar el pronóstico y evolución.

En nuestra práctica diaria clínica a nivel implantológico, ¿qué podemos conseguir valorando la densidad del hueso a intervenir antes de la cirugía implantológica, con un estudio tomográfico y posterior evaluación según Clasificación de Norton y Gamble, que correlaciona la densidad del hueso con Unidades Hounsfields?

Existen estudios que correlacionan científicamente una disminución generalizada de la densidad ósea a causa de una enfermedad (osteoporosis) con una equivalencia de hueso tipo IV de la Clasificación de Lekholm y Zarb (Flores y Ayala, 2012). En este caso, por ejemplo, preoperatoriamente podemos informar al paciente que el tiempo de osteointegración será mayor que en caso de mayor densidad ósea. También nos aseguraremos de tener un implante del mayor diámetro posible, que asegure la estabilidad primaria, además de preferir un implante cuyo sistema de rosca sea favorable a este tipo de hueso, prefiriendo un implante cónico a uno cilíndrico, y siendo el diseño macroscópico del implante muy importante en este caso (Nappe y Montoya, 2008) Intraoperatoriamente evitaremos el avellanado (Cavallaro et al., 2010), evitaremos carga inmediata (si la densidad es inferior a 350HU) (Cárdenas-Erosa et al., 2012), limitaremos el número de fresas y utilizaremos un torque de inserción bajo al colocar el implante (menos de 30 N·cm) (Concejo et al., 2005). De esta manera, es evidente que **el procedimiento a seguir será distinto según la densidad ósea y el uso del micro-TC sería de gran utilidad clínica** dado que Jaffin y Berman encontraron que el 35% de los implantes fueron perdidos después de 5 años en el hueso tipo IV frente al 3% de los colocados en huesos tipo I, II y III en el mismo período (Nappe y Montoya, 2008).

La densidad también puede influir en la cantidad de hueso neoformado, según cómo se produce el relleno de cavidades con injertos. Si **se compacta cuidadosamente en la cavidad aumenta la densidad celular**, y por ende la cantidad de hueso neoformado y su duración (Infante et al., 2007).

A la hora de valorar la interfase implante-hueso, existen test clínicos que se consideran invasivos y de los que no podemos justificar su uso en humanos, como el método de control de torque de retirada del implante que mide la fuerza de torsión necesaria para romper la interfase implante-hueso. Otro test clínico invasivo también es la toma de una muestra de la zona im-

plantada y su posterior medición microscópica a nivel histológico e histomorfométrico, para valorar la interfase hueso-implante.

Sin embargo, existen test clínicos no invasivos. El más común para valorar la estabilidad de un implante usa la técnica radiográfica, la cual valora la altura ósea marginal e identifica áreas radiolúcidas periimplantarias. Su limitación es que sólo valora cambios en sentido mesiodistal y representa bidimensionalmente una estructura que existe en tres dimensiones (Infante et al., 2007).

Otros métodos son el método Periotest® y el sistema de Análisis de la Frecuencia de Resonancia (método Osstell®). Sin embargo, se evidencia la **necesidad de más estudios no invasivos para valorar la estabilidad en implantes y para definir su grado de osteointegración** (Infante et al., 2007), siendo el estudio densitométrico a través del micro-TC un elemento prometedor.

Los experimentos con animales están, en general, aceptados por la población. Por ejemplo, el 75% de la población en Gran Bretaña lo aprueba siempre que sea con propósitos de investigación biomédica (Sondeo realizado por Market and Opinion Research International (MORI) el año 2005, a solicitud de Coalition for Medical Progress (CMP) (Vinardell, 2007).

Hemos decidido realizar nuestro modelo experimental in vivo concretamente en defectos óseos en conejos albinos de Nueva Zelanda, debido a que es difícil extrapolar los resultados conseguidos tras una investigación in vitro a la situación in vivo. De hecho y, según la Declaración de Helsinki, adoptada en 1964 por la XIII Asamblea Médica Mundial y revisada en cinco ocasiones, la investigación médica en sujetos humanos “debe estar basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación con animales” (Rodríguez, 2007). Si bien, el primer informe de la investigación experimental en modelo animal fue hecho por el padre de la fisiología experimental moderna, Claude Bernard, en 1860 (Watanabe et al., 2014).

Debemos mucho a las contribuciones de los estudios realizados en animales de laboratorio, entre otros se deben: las vacunas de la rabia (L. Pasteur, 1885), viruela (E. Jenner, 1798), tétanos, difteria, tos convulsa y poliomielitis; el desarrollo de diversos antibióticos, la insulina y el conocimiento de las bases genéticas de la herencia, los avances de la investigación en cáncer, cardiología, trasplantes de órganos, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida o en la enfermedad de Alzheimer (Hernández, 2006).

Es obvio que los resultados obtenidos entre las distintas especies, así como entre éstas y la especie humana, son diferentes. Pero es también cierto que, en la especie humana, no hay un solo modelo, y que también influyen múltiples factores (edad, sexo, condición fisiológica o pato-

lógica, etc). Los modelos animales se utilizan para entender “lo que sucede” y elaborar hipótesis para aplicarlas en ensayos humanos con suficiente seguridad (Morán, 2007).

Tenemos que tener en cuenta que, en el campo de los biomateriales, antes de determinar si un nuevo material posee estabilidad mecánica y es biocompatible para su uso clínico in vivo, hay que valorar su citocompatibilidad en las pruebas in vitro (Richards et al., 2001). Se acepta que la prueba in vitro se utiliza principalmente como una primera etapa para evitar el uso innecesario de animales en el ensayo de materiales citológicamente inapropiados (Al Pearce et al., 2007).

Es muy importante destacar que los cultivos celulares de ninguna manera reproducen la dinámica del hueso vivo / el medio ambiente en la superficie del implante (Coelho et al., 2009), y para tal fin, los modelos animales y subsiguientes ensayos clínicos (Groth et al., 1995) se muestran como la opción más fiable en la actualidad.

Los animales más utilizados para la investigación con implantes dentales son ratas, conejos, ovejas, perros, cerdos y primates no humanos. Entre los factores considerados para determinar qué modelo animal es el más apropiado para un protocolo de investigación destacan, en particular, aquellos que guarden similitud con los seres humanos, respecto a la zona de experimentación, bajo condiciones fisiológicas y patológicas, así como la disponibilidad de un gran número de especímenes. Otras consideraciones incluyen la aceptación de la sociedad, el coste, disponibilidad, edad, tamaño (la colocación de implantes múltiples para la comparación), la tolerancia a la cirugía y el cautiverio, la vivienda y la protección de animales.

El **conejo** es utilizado fundamentalmente en la producción de antisueros; farmacología, toxicología, teratogenicidad y reproducción (Hernández, 2006). Se utiliza en aproximadamente el 35% de los estudios de investigación musculoesqueléticos (Neyt et al., 1998). Sin embargo, los huesos de conejo comúnmente utilizados, tales como la tibia y el fémur son de los modelos menos similares en comparación con los humanos. Las macroestructuras óseas son significativamente diferentes (sobre todo cuando se compara la cantidad de hueso trabecular del hueso alveolar de humanos con huesos largos de conejo); también la micro-estructura, y la cinética (Coelho et al., 2009). El conejo tiene, en comparación con otras especies (primates y algunos roedores), el recambio óseo más acelerado (Castaneda et al., 2006; Newman et al., 1995). Esto puede hacer que sea difícil extrapolar los resultados de estudios realizados en conejos sobre la probabilidad de una respuesta clínica humana (Al Pearce et al., 2007).

Por lo tanto, la extrapolación de los resultados obtenidos en estudios en conejos en relación con los seres humanos es un reto y debe ser realizado cuidadosamente (Coelho et al., 2009). No obstante, se utilizan comúnmente para la detección de materiales de implante antes de la prueba en un modelo de animal más grande (Al Pearce et al., 2007).

Entre las ventajas de este modelo animal encontramos, además de su facilidad de manejo y tamaño, que alcanza la madurez esquelética alrededor de los 6 meses de edad, (Gilsanz et al., 1988). Destacamos que es dócil y no agresivo, facilitando su manejo y observación. Precisa una alimentación sencilla (Fuentes et al., 2010), es ampliamente criado, y además, es muy económico en comparación con el gasto de animales más grandes, tanto en su obtención como su mantenimiento (instalaciones más elaboradas y caras). Tiene ciclos vitales cortos (gestación, lactancia, pubertad) y un rápido metabolismo óseo, permitiendo obtener muestras a corto plazo para su estudio. También presentan una elevada resistencia a infecciones presentando calidad y cantidad de anticuerpos (Fuentes et al., 2010).

Entre sus mayores inconvenientes destaca su tamaño, limitado por cuanto al tamaño y al número de implantes, que según el estándar internacional para la evaluación biológica de dispositivos médicos es un máximo de 6 implantes por conejo (norma internacional ISO 10993-6, 1994), siendo la mitad del número máximo de implantes recomendadas para ovejas, perros, cabras y cerdos (Al Pearce et al., 2007).

Otro modelo animal a destacar en la investigación de implantes dentales sería el **modelo canino** (Coelho, 2009), que se utiliza mucho en el sector dental y musculoesquelético. Asimismo, los macacos y los perros parecen ser los modelos de elección de los estudios preclínicos de la enfermedad periodontal y los procesos dentales, por ejemplo, en los molares, asociados a la pérdida de masa ósea, ya que son similares al de los humanos a nivel estructural, fisiológico y anatómico (Bagi et al., 2011). Neyt et al. (1998) encuentra que los perros y gatos se utilizaron en el 11% de la investigación musculoesquelética entre 1991 y 1995, revisión confirmada por Martini et al. (2001), quien informa de que entre 1970 y 2001, en el 9% de los estudios ortopédicos fueron los perros los utilizados como un animal modelo.

El hecho que los perros pueden formar parte activa en los protocolos de recuperación es una de las ventajas más destacadas. Su condición de animales de compañía es el punto más controvertido desde el punto de vista ético en la investigación médica.

Aerssens et al. (1998) encontró más similitud en la composición ósea entre el perro y el humano en un estudio que examinaba las diferencias en la composición ósea, la densidad y la calidad entre diferentes especies (humanos, perros, ovejas, cerdo, vaca y pollo). No obstante, hay que acoger estos datos anteriores con cautela, toda vez que existe una diferencia evidente en la tasa de remodelación entre ambas especies. Así, cambios asociados a los implantes de manera evidente en un modelo canino puede no serlo en el ser humano por la menor tasa de remodelación en éste último (Bloebaum et al., 1991; Bloebaum et al., 1993).

En 1993 se produjo el primer encuentro del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos [European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)], en el que se decidió que era prioritaria la implementación de “las tres erres” (reemplazo, reducción y refinamiento) (Jar, 2014), concepto presentado por primera vez en 1959, en el libro titulado “Los principios de las técnicas de experimentación animal humano”, escrito por William Russell y Rex Burch (Watanabe et al., 2014; Jar, 2014). El “reemplazo” consiste en la sustitución de animales más grandes por otros más pequeños. La “reducción” consistiría en limitar el número de animales al mínimo que permita llegar a los resultados buscados. Y con el “refinamiento” se mide y controla, mediante analgésicos, anestésicos y tranquilizantes, el dolor y estrés, aplicando, si es necesario, la eutanasia anticipada. El costo y la conveniencia no pueden anteponerse a estos tres principios y las autoridades regulatorias deberían vigilar su cumplimiento (Jar, 2014).

En la búsqueda de biomateriales hemos determinado que aquel que se emplea como sustituto óseo ha de poseer una serie de requisitos; bioabsorción, biocompatibilidad, osteoconducción/osteoinducción, estructuralmente similar al hueso, fácil manejo, relación coste/efectividad adecuada (Tatay et al., 2008).

Tenemos que tener en cuenta que el uso de productos naturales en las investigaciones como agentes biomédicos está muy extendido. Nosotros nos hemos fijado en el grupo de flavonoides cítricos, presentes de forma amplia en el reino vegetal (las naranjas, mandarinas, pomelos y cítricos ácidos, como son también la bergamota y el limón) y consumidas en la dieta de una manera segura, hasta tal punto que se han creado productos farmacéuticos con sustancias bioactivas con flavonoides para su consumo. Este grupo, si bien han sido estudiados durante décadas de investigaciones, algunos los mecanismos celulares involucrados en su acción biológica aún no se conocen totalmente.

De los flavonoides cítricos, destacamos sus propiedades antioxidantes, con efectos biológicos sobre la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (antitrombóticos, antiisquémico, antioxidante, y vasodilatador), cáncer, neurodegenerativas, hasta las inflamatorias crónicas y alérgicas, entre otros.

Dentro de los flavonoides cítricos, hemos prestado atención especial, por su protagonismo en estudios relacionados con el hueso, a la **naringina**, descubierta en 1857, encontrada en altas concentraciones en los pomelos, naranjas amargas, y en uvas, teniendo una fácil disponibilidad tanto en la dieta como en los métodos de extracción industrial para su aislamiento y consumo.

El objetivo de esta investigación ha sido profundizar en el papel de este flavonoide en el hueso, ya que tenemos la experiencia previa de estudios exitosos realizados con este flavonoide en el hueso, tanto in vitro como in vivo.

La finalidad de este trabajo ha sido poder estudiar la regeneración ósea con un flavonoide como es la naringina en combinación con colágeno y de una amalgama resultante entre la combinación entre la naringina y extracto de uva, tanto en grandes como en pequeños defectos, para valorar su papel en los cambios densitométricos que se pudieran dar en el hueso.

Nuestro objetivo era interpretar, por cuanto a densidad se refiere, los efectos que tienen los biomateriales en el hueso, respecto al grupo control, de una manera no invasiva, al contrario que otras técnicas, como la anatomía patológica, ya que nuestro fin último es determinar la calidad de hueso en un paciente humano y, como sabemos, no sólo es importante la cantidad de tejido óseo sino también la densidad, medido en unidades Hounsfield (HU).

Ya hay antecedentes de estudios que relacionan un alto consumo de frutas y hortalizas y la mejora de la densidad ósea mineral. Dado que en los cítricos hay muchos tipos de flavonoides, interesa delimitar el papel de cada uno en la mejora de la densidad ósea mineral, en caso de que exista. En Estados Unidos, se examinó la asociación entre la ingesta habitual de subclases de flavonoides y la densidad mineral ósea (DMO) en una cohorte de gemelas, con un total de 3160 mujeres, mediante un cuestionario semicuentativo de frecuencia alimentaria con posterior evaluación densitométrica. Se asoció positivamente con la DMO, con efectos observados para las antocianinas y flavonas tanto en la cadera como en la columna vertebral (Welch et al., 2012).

Los flavonoides cítricos tienen efectos a nivel general del organismo, así, existen productos con presencia de flavonoides cítricos que han sido ampliamente utilizados por los grupos étnicos de la India para tratar la inflamación, reumatismo, dolor de cabeza, fractura ósea, ictericia, etc, como la *Drynaria quercifolia* (que contiene un 1,2% de naringina y un 0,02% de su aglicona naringinena). En este experimento, se administró *Drynaria quercifolia* por vía oral a ratas Wistar y ratones albinos Swiss y a los que previamente se les había provocado un edema en la pata. Se contrastó, tras medir diariamente el volumen del edema y tiempo de lamido de la pata, el efecto analgésico y antiinflamatorio de este producto, observándose una reducción significativa del tamaño del edema. También resaltamos de este estudio la búsqueda de posibles síntomas tóxicos, así, todos los animales se observaron continuamente durante las primeras 3 h y luego 1 h intermitentemente hasta 24 h durante 7 días después del tratamiento. El objetivo fue detectar, aparte de mortalidad, cambios de comportamiento como convulsiones, hiperactividad, pérdida de pelo, frecuencia respiratoria, ingesta de alimentos y agua y cualquier otra anomalía relevante. Se concluyó que la administración oral de *D. quercifolia* hasta 5 g / kg no produjo ningún cambio de comportamiento ni letalidad (Anuja et al., 2010).

Otro efecto general del flavonoide cítrico en el organismo es el papel como captador de radicales libres (responsables de la inducción de daños en el ADN celular). En este estudio realizado en ratones, se administró naringina a una concentración de 2 mg/kg a ratones previamente a

su irradiación con rayos gamma. Se contrastó, tras el estudio al cabo de unas horas de la irradiación, el efecto antioxidante y anticancerígeno de la naringina al reducir el daño inducido por las radiaciones (Jagetia et al., 2003; Jagetia y Reddy, 2002).

En la línea de investigación anticáncer, Miller y cols. evaluaron la actividad antineoplásica de seis flavonoides cítricos. Este experimento realizado con hámsters, se hizo aplicando tópicamente las soluciones de los flavonoides (2,0-2,5%) y la solución del carcinógeno 7,12-dimetilbenzoantraceno o (DMBA), en la mejilla de los roedores. Naringina y la naringenina disminuyeron significativamente el número de tumores. La naringina también disminuyó significativamente el tamaño o peso del tumor (Miller et al., 2008).

No sólo es importante determinar la efectividad del flavonoide cítrico objeto del estudio, sino cuál es la concentración óptima. Así, destacamos un estudio con naringina en la línea de efectos protectores de la radiación (radioprotectores), donde diferentes concentraciones de naringina (0, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 8 mg/kg de peso corporal) se administraron a ratones para valorar los efectos protectores en la médula ósea frente a la radiación gamma (exposición de 2Gy), la dosis óptima fue la de 2mg/kg (Jagetia y Reddy, 2002).

Para evaluar la actividad antimutagénica de la naringina se ha utilizado en este estudio de Attia (2008) la lomefloxacin, que es un fármaco utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, pero tiene actividad mutagénica como efecto no deseado. Se utilizaron 70 ratones albinos suizos blancos machos adultos de 10-12 semanas de edad. Además de la administración de este fármaco, los ratones se dividieron en varios grupos de 10 miembros cada uno y se administró tratamiento con naringina en diferentes dosis (5 y 50 mg/kg) en algunos grupos. Los animales fueron sacrificados 24 h después del tratamiento con lomefloxacin viéndose que la naringina no fue ni genotóxica ni citotóxica a las dosis ensayadas. El pretratamiento con naringina se tradujo en una disminución de la mutagénesis ocasionada por lomefloxacin en estos animales, de forma dosis-dependiente (Attia, 2008). El hecho de que la naringina es un antioxidante seguro y fácilmente disponible hace necesaria la aplicación de estudios que indiquen su interacción con las drogas.

Como vemos, existen estudios que demuestran una serie de efectos biológicos de flavonoides cítricos sobre el organismo, ahora veremos algunos en los cuales tienen efectos sobre el hueso. *Drynariae rizoma* tiene la naringina como componente principal. Este estudio se realizó con ratas y se llegó a la conclusión de que la *Drynariae rizoma* podría reducir la reabsorción ósea en el hueso alveolar. Este producto también ejerce un efecto osteogénico en los osteoblastos. El estudio in vivo indicó un valor elevado de densidad ósea mineral en los tejidos periodontales de los grupos que contenían naringina después de 10, 20 y 30 días de perfusión ( $p < 0,05$ ) (Chen et al., 2011). Si bien el estudio tiene una aplicación breve de tiempo, convendría hacer estudios más longevos para ver el efecto de *Drynariae rizoma* sobre la densidad mineral ósea.

La naringina también se utilizó aquí, donde Chen et al (2013), añadieron una concentración predeterminada de naringina a un compuesto llamado GGT, dando como resultado el llamado GGTN (el mismo GGT pero con naringina). Se evaluó el potencial de los materiales compuestos en la reparación de defectos óseos en la bóveda craneal de conejos y se comparó in vivo su respuesta biológica. Se observó que la concentración más eficaz de naringina era 10 mg/mL. El análisis radiográfico reveló mayor crecimiento de hueso nuevo en el material compuesto GGTN que en el compuesto GGT, a las 2, 4 y 8 semanas después de la operación. Por lo tanto, se concluyó que el material compuesto GGTN es muy prometedor para el uso como un material de injerto óseo (Chen, 2013).

Hay veces que para valorar la mejora, o no, de densidad mineral ósea, hay que provocar una patología en un modelo experimental animal. Así, en este caso, se realizó una ovariectomía para provocar una bajada de la densidad ósea (osteoporosis). A continuación, se administraron a varios grupos de ratones durante 6 semanas 2 dosis de naringina, una (0,2 mg por gramo y día) y otra de (0,4 mg por gramo y día). Tras ello, se midieron las densidades óseas trabeculares y corticales del fémur izquierdo, tibia y columna lumbar región L1, con una máquina StraTec XCT2000. Se contrastó que aquel grupo de ratones ovariectomizados que recibió la dosis más baja de naringina (0,2 mg por gramo y día) aumentó significativamente la DMO total del fémur distal y la DMO trabecular de la tibia proximal en un 12 y un 26% respectivamente, mientras que el grupo de ratones ovariectomizados que recibió una dosis más alta de naringina (0,4 mg por gramo y día) aumentó significativamente la DMO total en los tres sitios en un 15-19%, así como la DMO trabecular del fémur distal en un 17% (Pang et al., 2010). En esta línea observamos también una mejora de densidad ósea mineral en ratas en este estudio que describiremos a continuación. En este caso y, tras inducir durante 14 días a la osteoporosis con ácido retinoico (in vivo), se contrastó que aquellas ratas tratadas con naringina tenían una densidad mineral mayor en el fémur que aquellas no tratadas. Además, las tratadas con naringina tuvieron una menor actividad de la fosfatasa alcalina en suero (Wei et al., 2007).

Chiba et al (2003) también aplicaron la ovariectomía, en este caso sobre ratones, para ver los efectos de otro flavonoide cítrico, en este caso **hesperidina**. Tras su ovariectomización y administración de una dieta que contenía hesperidina durante 4 semanas, se procedió a su sacrificio y posterior análisis de los datos. La administración de hesperidina no afectó el peso uterino y se contrastó que la misma impidió significativamente la pérdida ósea, consecuencia de la ovariectomización, respecto al grupo control (Chiba et al., 2003).

Con hesperidina también se realizó este estudio con ratas ovariectomizadas jóvenes (3 meses) y adultas (6 meses), alimentadas a base de una dieta con caseína y complementadas, o no, con hesperidina al 0,5% durante 3 meses. En los animales tratados se observó una inhibición parcial de la pérdida ósea en las ratas adultas debido a la ovariectomía, la inhibición fue

completa en el caso de las ratas jóvenes. Como valor positivo añadido, hubo una disminución de lípidos que, junto con los beneficios de los huesos obtenidos con la hesperidina lo convierten en un atractivo agente de la dieta para la gestión de la salud de las mujeres postmenopáusicas (Horcajada et al., 2008).

Si queremos valorar de forma cuantitativa y no cualitativa a través de la densidad, sino directamente la cantidad de hueso formado, entonces destacaríamos el trabajo publicado por Wang et al., (2006), donde se realizaron veinte defectos óseos de 5 mm x 10 mm en el hueso parietal de 14 conejos blancos de Nueva Zelanda. En el grupo experimental, 5 defectos fueron injertados con la solución de naringina mezclado con matriz de colágeno y 5 defectos fueron injertados con hueso autógeno endocondral. En los grupos de control, 5 defectos fueron injertados sólo con matriz de colágeno (control activo) y 5 habían quedado en blanco (control pasivo). Los animales fueron sacrificados a los 14 días y, tras el análisis de las muestras, se determinó que un total de 284% y 490% más de hueso nuevo estuvo presente en los defectos injertados con naringina en matriz de colágeno que aquellos injertados con hueso y colágeno, respectivamente. Concluyeron que la naringina en matriz de colágeno tiene el efecto de aumentar la formación de hueso nuevo a nivel local y puede ser utilizado como material de injerto óseo (Wong y Rabie, 2006a; Wong y Rabie, 2006b).

Si queremos comparar los efectos sobre el hueso de **dos flavonoides cítricos**, bien de forma aislada o combinada, entonces acudimos a este estudio realizado sobre roedores (Habauzit et al., 2011). Estos animales fueron tratados durante 3 meses con una dieta de caseína en combinación con hesperidina (0,5%), naringina (0,5%) y combinación de ambas (0,25% de cada flavanona). Transcurrido este tiempo, se vió una mejora significativa de la integridad del hueso del fémur como reflejan los valores de la densidad mineral total y regional ósea. Los que mayor efecto experimentaron fueron los tratados con hesperidina, seguidos de los tratados con naringina, que mejoró sólo en lugares específicos; finalmente, la combinación de hesperidina y naringina no aportó efectos positivos. Además y, de forma sorprendente, los niveles plasmáticos circulantes de naringina (8,15µM) era cinco veces mayor que la hesperidina (1,44µM) a dosis equivalentes (0,5%) y se observó una reducción lineal de los niveles plasmáticos en la co-administración (0,25% cada uno). También se observaron efectos antiinflamatorios en los tres grupos (Habauzit, 2011). Podemos deducir entonces que hay una ausencia de competencia por sus sitios de absorción intestinal y el metabolismo.

En este estudio, se aplicaron tres bioflavonoides. Wood (2004), comparó la influencia de rutina, quercetina y naringina en la dieta, durante 42 días en 40 ratas jóvenes albinas macho, con una concentración de 0,57% de cada uno a expensas de la glucosa. Tras el análisis de las distancias en el cráneo, se observe una reducción de la distancia de la cresta ósea alveolar del molar y la unión cemento-esmalte respecto a los grupos control, lo que indicaba que los tratamientos favorecían el desarrollo alveolar en ratas macho jóvenes, además, el grupo de naringi-

na fue el que obtuvo la distancia más baja, excepto en la región lingual, respecto a quercetina y rutina (Wood, 2004).

Análogamente con el estudio anterior, el mismo autor y al año siguiente (Wood, 2005), estudió los efectos de las dietas suplementadas con 0,09%, 0,18%, 0,36% y 0,72% de **naringenina**, a expensas de la glucosa, en 40 ratas jóvenes, repartidas en cinco grupos, por un período de 42 días. Se analizaron los cráneos de los roedores durante el desarrollo alveolar, puntuándose la distancia de la cresta ósea alveolar molar a la unión cemento-esmalte. A mayor dosis de naringenina, menor distancia existía entre la cresta ósea alveolar del molar y la unión cemento-esmalte, con diferencias estadísticamente significativas (Wood, 2005).

Si bien existe poca bibliografía en relación a la densidad ósea y el uso del micro-TC, podemos destacar varios estudios en humanos y animales. Además, según el lugar específico del estudio con el micro-TC, los resultados son coherentes con la distribución real de la densidad mineral del hueso, así, se asocian valores HU más altos en la zona de la diáfisis respecto a otros más bajos, como en el cuello de la cabeza femoral (Ramírez et al., 2013). A nivel oral, también existe correlación entre los distintos lugares de la mandíbula y maxilar con la densidad ósea. En un estudio, se evaluó la correlación entre la densidad ósea y la micro arquitectura tridimensional del hueso trabecular en treinta y cuatro especímenes de huesos de mandíbula de cadáver humano. Con el uso de micro-TC, se relacionó la fracción de volumen óseo (BV) y el valor de densidad mineral ósea (DMO) con los parámetros de micro-arquitectura tridimensional, que representan la calidad del hueso trabecular, dentro de un volumen determinado. Se contrastó una diferencia significativa entre el maxilar y la mandíbula. Todos los parámetros de micro arquitectura fueron más altos en la mandíbula, hasta 3,3 veces mayores que los del maxilar superior (Kim y Henkin, 2015).

Gracias a los grupos control empleados en nuestro estudio pudimos ver el estándar de una cicatrización tras una injuria ósea, en nuestro caso, la realización de un lecho quirúrgico, contrastando una correlación entre la región anatómica y el valor marcado en el histograma. Sirva como ejemplo la cortical contralateral en las tibias respecto al defecto, con valores claramente más elevados, debido a la mineralización. Si bien han transcurrido 6 meses, en la zona del defecto no se produce una reparación tras el trauma que restituya una cortical idéntica a la que existía antes de la intervención.

Una importante correlación también se ha observado en los maxilares y mandíbulas, aunque aquí no se aplicaron grupos control, donde se aprecia un valor muy elevado que destaca en todos los histogramas, correspondiente a la región del incisivo contralateral. Este hecho entraría dentro de la lógica, aunque no sea un modelo experimental humano, ya que los dientes poseen los tejidos más duros del cuerpo humano, los cuales están compuestos de tres tejidos duros que son la dentina, el esmalte y el cemento y un tejido blando que es la pulpa. Si bien el

esmalte muestra una elevada dureza debido a la fase inorgánica del esmalte maduro, que es el 95% del peso total (Chávez et al., 2011), es la dentina el tejido que ocupa la mayor parte del diente y la cual está conformada por 50% de material mineral (Hidroxiapatita), 35% de material orgánico (Colágeno tipo I) y 15% de agua. También es verdad que existe una disminución de la dureza del diente humano conforme se avanza de la dentina superficial a la profunda, atribuible al hecho de que el número de túbulos dentinarios aumenta conforme nos acercamos a la pulpa (Saha et al., 2017). En este sentido, se han reportado valores para la densidad de túbulos entre 15.000 y 24.000 túbulos/mm<sup>2</sup> para la dentina superior; entre 35.000 y 40.000 túbulos/mm<sup>2</sup> para la dentina media; y entre 43.000 y 65.000 túbulos/mm<sup>2</sup> para la dentina inferior (Montoya y Ossa, 2013)

Para el estudio de los histogramas hemos considerado que, en el maxilar superior, en la zona anterior, existe un hueso con poco trabecular disponible y muy corticalizado debido a la cortical del conducto palatino anterior, los ápices de los incisivos centrales, el hueso palatino y la espina nasal anterior. En el extremo contrario, Norton y Gamble indican que algunas tuberosidades presentan valores negativos (<0 HU) debido a su alto contenido de grasa en médula (Norton Mr et al., 2001). También se ha observado que puede haber grandes diferencias o saltos de densidad en un espacio muy reducido (de pocos milímetros) y que puedan existir áreas más mineralizadas al lado de otras menos densas, sin solución de continuidad entre ellas, tanto en hueso maxilar como mandibular. Por este motivo, hemos puesto especial cuidado en delimitar la zona del defecto mediante líneas para no abarcar estructuras anatómicas que podrían interferir en la interpretación de los resultados y, dentro de los histogramas, escoger aquellos cuyas líneas pasen visualmente por la zona del defecto, dejando las demás para orientarnos.

Algunos estudios que indican que el uso del **micro-TC se presenta como una prueba objetiva, no invasiva y que valida de manera científica la densidad ósea** son éstos. Hofstaetter et al (2006) indujeron osteonecrosis quirúrgicamente en cabeza femoral en 17 conejos machos adultos, utilizándose el lado contralateral como control. A las 4 semanas no se encontraron cambios en la microarquitectura en la cabeza femoral ni en el acetábulo. A los 6 meses el proceso de reparación condujo a un aumento de la masa ósea en la región trabecular de la cabeza femoral. Sin embargo, se observó una disminución en la densidad mineral ósea volumétrica y un aumento en la porosidad en la región subcondral compacta y cortical de la cabeza femoral osteonecrótica (Hofstaetter et al., 2006). Bouchgua et al (2009) realizaron un estudio sobre osteoartritis en conejos con equipo clínico de tomografía computerizada, y evaluaron los cambios que existían en la densidad mineral ósea a diferentes profundidades en el fémur y la tibia in vivo y de forma no destructiva. Se analizaron las articulaciones de las rodillas de los conejos, 10 con transección del ligamento cruzado anterior y contralateral, y 6 como grupo control no operados, realizándose mediciones hasta 3 meses después. Este estudio reportó una disminución significativa en la densidad mineral ósea subcondral asociada con la progresión temprana de osteoartritis en un modelo animal (Bouchgua et al., 2009).

En la línea que afecta a la valoración con TC de la interfase implante-hueso, destacamos un estudio realizado sobre 28 pacientes (18 mujeres y 10 hombres), que tenían indicación de extraer sus premolares inferiores y, en su lugar, colocar implantes dentales inmediatos. En este caso, se dividieron al azar en dos grupos iguales (14 pacientes cada uno). El grupo A recibió implantes dentales inmediatos sin material de relleno alrededor de los implantes, mientras que en el grupo B se insertó un biomaterial que relleno los huecos óseos alrededor de los implantes, en concreto, una mezcla de partículas de fosfato beta-tricálcico multiporoso de fase pura (beta-TCP), con un diámetro de 500-1000  $\mu\text{m}$  (Cerasorb M, Curasan AG, Lindigstrasse, Kleinstheim, Germany), con una solución salina normal estéril. Tres y seis meses después de cargar los implantes, se realizó una TC, sagital y coronal, cuya precisión y reproducibilidad para medir la densidad ósea alrededor de los implantes está contrastada, **evitando la biopsia ósea**. El análisis estadístico de los datos recogidos indicó un aumento significativo en las mediciones de la densidad ósea de 3 a 6 meses sólo en el grupo B ( $p < 0,05$ ). Además, la diferencia entre el grupo A y B en las mediciones de densidad ósea alrededor de los implantes fue estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) a sólo 6 meses después de la carga (Emad, 2013). Gracias a los valores densitométricos obtenidos con la TC podemos deducir que este biomaterial (beta-TCP) no interfiere en la cicatrización ósea cuando se coloca en los huecos óseos alrededor de implantes dentales inmediatos, siendo un material biocompatible. Además, es contrastable el aumento de densidad con el biomaterial respecto al grupo sin relleno, lo que haría interesante su uso como biomaterial. También observamos que, conforme pasan los meses, aumenta el valor numérico de la densidad, lo que indica la **conveniencia de realizar estudios prolongados** en el tiempo. Como sustituto óseo sintético, se podría ampliar su estudio usando diferentes formas y tamaños en las partículas, con distintos niveles de porosidad y solubilidad, para ver su mejora o no, en valores densitométricos (Emad, 2013). En nuestro experimento seguimos esta línea, y, seis meses después de la cirugía, evaluamos los cambios densitométricos a nivel óseo para valorar el efecto de los diferentes grupos de biomateriales.

Para saber los **tiempos de cicatrización ósea** tras practicar un lecho óseo en nuestro modelo experimental animal destacaremos un estudio donde se evaluó histológicamente la evolución de la cicatrización ósea en lechos control en la cresta iliaca de 16 conejos machos de Nueva Zelanda, a las 4, 8, 12 y 16 semanas (Domínguez et al., 2007). A las **4 semanas** se observaba en la cresta iliaca del grupo control un hueso suave constituido por la matriz extracelular en porción orgánica laxa depositada por osteocitos y osteoblastos. También era observable la formación del hueso nuevo a partir de la periferia hacia el centro de las trabéculas. A las **8 semanas** se observaba la matriz extracelular granular sobre la cual se localizaba un número reducido de osteocitos. A las **12 semanas** se distinguía un acomodo en osteonas de la matriz extracelular granular, la cual continuaba calcificándose y observaba la formación de lagunas y de conductos de Havers. A las **16 semanas** se observaba condensación de la matriz extracelular granular que continuaba con la formación de lagunas producto de su calcificación. En otro es-

tudio realizado con el mismo fin, esta vez realizado en tibias de conejos, se evidenció a las 8 semanas en el grupo control una extensa formación ósea, cuya extensión aumentó al cabo de 12 y 16 semanas (Martínez et al., 2009). En la línea de que de manera no invasiva podemos obtener información relevante con el micro-TC en lo referente a la cicatrización ósea en un tiempo relativamente largo también hay un experimento con ratas, donde se establecieron 2 grupos, un grupo donde sus sujetos presentaban osteoporosis inducida y otro grupo sin esta patología. A ambos grupos se les practicó una fractura en el eje medio del fémur. En el caso del grupo osteoporótico se realizó la fractura a los tres meses de la ovariectomía. Se estudió su evolución en términos de densidad al mes, dos meses y tres meses. La densidad ósea mineral fue significativamente menor en el grupo osteoporótico al cabo de dos meses en comparación con el grupo control, lo que indica un retraso en la cicatrización ósea, algo que en estudios humanos también sucede. A los tres meses los datos del Micro-TC indicaron que el callo óseo y el hueso recién formado eran aproximadamente un 20% más bajos en el grupo osteoporótico respecto al grupo control (Y. Hao et al., 2007)

Hay estudios que reflejan la conveniencia de realizar mediciones densitométricas cada cierto tiempo, como éste, donde a 24 conejos adultos de raza blanca de Nueva Zelanda se les practicó una transección del ligamento cruzado anterior, en la rodilla izquierda y los 11 restantes, de un total de 35, se les mantuvo como grupo control. Los animales operados fueron sacrificados al mes, dos meses y 3 meses de la intervención. En el examen de micro-TC, la articulación femorotibial de conejos a los que se les practicó la intervención indicó una disminución de la densidad mineral ósea a las 4 y 8 semanas, que volvió a los valores de control 12 semanas después. Ello indica que la densidad disminuye drásticamente (un 30% de reducción) después de la cirugía y, a diferencia de otras investigaciones en otros modelos animales, regresa a los valores de control 12 semanas después de la cirugía. Destacamos el factor tiempo por el cambio densitométrico que indicó un cambio de tendencia de los valores del micro-TC, a los tres meses, en contraposición a los valores obtenidos a los dos meses (Danika et al., 2004). En esta línea, Rudert (2002) es partidario de periodos de seguimiento en algunos estudios de al menos 6 meses y, si los resultados son prometedores, debe elegirse un período de seguimiento de al menos 12 meses. El motivo que esgrime es que se da un aumento de los cambios degenerativos después de 48 semanas en todos los animales, incluso degeneración de reparaciones de defectos osteocondrales que seguían aumentando 12 meses después de la intervención inicial (Rudert, 2002). Una limitación de nuestro estudio sería precisamente, no poseer información de los estadíos más precoces de cicatrización.

Un estudio muy parecido al nuestro, fue realizado sobre diez conejos de Nueva Zelanda, en los que se cavidades óseas quirúrgicamente en la tibia, de forma bilateral. En este caso, los injertos que se depositaron fueron bloques de dentina de premolares humanos extraídos por razones ortodóncicas, en 16 tibias. Asimismo, se prepararon 4 tibias con las mismas cavidades, pero sin ser sometidas a injerto, sirviendo como controles. Cinco conejos fueron sacrificados

después de 3 meses y cinco conejos **después de 6 meses, igual que en nuestro estudio**. En las regiones corticales de la tibia, la fusión de hueso con dentina se observó en el 86% de la superficie de la dentina después de 3 meses y el 98% después de 6 meses. En los bloques de dentina insertados en el espacio de la médula ósea, se formó hueso en el bloque dentinario cubriendo un promedio de 51% de la dentina después de 3 meses y cubriendo el 77% después de 6 meses. Todos los bloques de dentina se curaron con anquilosis en contacto con el hueso y sin reacciones inflamatorias. En este caso, si bien no hubo estudio densitométrico sino histológico y se evaluó el área de anquilosis, lo interesante de este estudio fue la diferencia de los tiempos de sacrificio y la mejoría que hubo a los 6 meses respecto a los 3 meses, lo que indica la **conveniencia de hacer estudios largos en este tipo de modelo experimental**, aunque siempre es útil hacer estudios complementarios para ver posibles cambios densitométricos a lo largo del tiempo (Andersson, 2010).

A veces, para valorar el impacto de un agente externo sobre el cuerpo y su efecto en la cicatrización ósea se necesita que transcurra un tiempo largo, como en este estudio, en el cual se inyectó nicotina subcutánea (6 microg/kg/min) a 10 conejos hembras o suero salino solo (control) a otras 10, durante 8 meses. Seis meses después del inicio de la administración de los tratamientos, se prepararon osteotomías e insertaron implantes. Y, tras su sacrificio, el análisis histomorfométrico del contacto hueso-implante y la densidad ósea en los defectos óseos no revelaron diferencias entre el ensayo y el grupo de control después de 2 ó 4 semanas de cicatrización (Gotfredsen et al., 2009). Podemos concluir que existen patologías en las que es interesante alargar el tiempo de estudio, como éste. Hay otros estudios, sin embargo, sobre patologías, en los que no interesa alargar los tiempos, por ejemplo, modelos de cicatrización ósea comprometida con animales con osteoporosis o irradiados, ya que lo que queremos es ver si existen diferencias o no debido a los tratamientos a corto y medio plazo. Así que se trata de individualizar el estudio en función de lo que queremos estudiar.

Si bien, hay muchos estudios con tibias de conejos, hay poca literatura en relación a la aplicación de biomateriales del grupo de flavonoides cítricos o sus efectos a nivel densitométrico. Por este motivo, hemos decidido implantar un injerto con un flavonoide cítrico, como es la naringina, de fácil obtención, para valorar su efecto óseo en un tiempo relativamente largo (6 meses) para ver sus cambios a nivel de densidad, a fin de valorar la conveniencia de ampliar con más estudios en el caso de que los resultados indiquen una mejoría densitométrica en los defectos con los biomateriales empleados. El estudio lo hemos realizado en la tibia de conejos, habida cuenta de la abundancia de bibliografía en esta zona de este modelo experimental animal, pero también en el maxilar y mandíbula. Para la zona maxilar y mandibular se suelen usar animales más grandes, como monos y modelos de perros. El tamaño anatómico del conejo, que es limitado, es el principal obstáculo. Sin embargo, en un estudio publicado por (Mohammad et al., 2017), un cráneo postmortem de un conejo de Nueva Zelanda fue sometido a un estudio osteológico y de imágenes. Se realizó una cirugía de defecto post-mortem y se ilustró con tomografía

micro-computerizada. A continuación, se ensayó un modelo quirúrgico in vivo en 16 conejos para realizar cirugía de creación de hendidura alveolar in vivo para valorar la viabilidad de un injerto adecuado de las deformidades de las hendiduras alveolares, ya que sería un paso esencial para restablecer el arco dental en pacientes humanos con fisura palatina.

Su autor demostraba que es posible realizar injertos óseos alveolares en un área del sitio quirúrgico similar al de la población pediátrica en sujetos humanos, tras la extracción de un diente incisivo central. Incide, además, en permitir 8 semanas de cicatrización para producir un defecto predecible y de buen tamaño (Mohammad et al., 2017). Este estudio es muy parecido al nuestro en el que, dada la escasa bibliografía de estudios con biomateriales en esta zona, hemos decidido abarcar, no sólo las tibias, sino también el maxilar y la mandíbula, a fin de minimizar el número de sujetos y, por otro lado, ver la evolución del biomaterial a nivel de los huesos maxilares.

En nuestro experimento, estudiadas las muestras, no se evidenciaron diferencias significativas macroscópicas en las mismas lo cual es posiblemente atribuible, en parte, al tiempo transcurrido desde el inicio de la intervención. Se realizaron las mediciones con micro-TC, con el fin de valorar la densidad, ya que los valores en HU nos indicarían, si eran altos, una buena salud o calidad ósea, en contraposición a unos valores bajos. El método de obtención de los valores densitométricos se ha contrastado que es fiable y reproducible, tanto en humanos como en nuestro modelo experimental, si bien, el tiempo de estudio no sabemos si ha sido largo o corto puesto que hay muchos estudios en ambos sentidos y muy pocos con nuestro producto de experimentación sobre el modelo experimental de conejo. Sería interesante realizar más estudios con un menor plazo para ver la evolución tras la aplicación del biomaterial y observar cómo varían en HU a 1 mes, 2 meses y 3 meses.

Tras analizar los resultados de los histogramas, obtenidos tras el sacrificio de los conejos a los seis meses, podemos deducir que la naringina, bien sea sola o combinada con colágeno o extracto de uva, tuvo un impacto positivo en la cicatrización ósea, a nivel densitométrico, una vez que se cometió una injuria ósea (lecho practicado con trefina) y su posterior depósito con biomaterial. El porcentaje global de score positivos (1+ y 2+), donde se integran todos los grupos que presentan naringina sola o bien combinada con colágeno o extracto de uva, resultó ser de un 73%, si bien este porcentaje varía según el ámbito de aplicación o en función de la combinación, si la hubiera. Así, la naringina sola, aplicada en las tibias hizo que la densidad tuviera cambios positivos en un porcentaje de un 71% frente a un 29% de las muestras que no indicaron cambios que indiquen una mejoría densitométrica o score (0). La naringina en combinación con colágeno, sin embargo, mejoró la cifra anterior, reportando un 85% de score positivos (1+ y 2+) frente a un 15% de score (0), si bien, el ámbito de aplicación, aparte de las tibias, se extendió al maxilar superior. La amalgama resultante de naringina en combinación con extracto de uva arrojó un resultado de 62% de score positivos frente a un 38% de score (0), realizado en

tibias y mandíbula. En esta combinación de naringina y extracto de uva llama la atención que hubo 4 resultados positivos (3 de 1+ y 1 de 2+) y 2 de score (0) en tibias y 4 resultados positivos (3 de 1+ y 1 de 2+) y 3 score (0) en mandíbula, lo que puede ser, entre otras razones, porque la mandíbula ofrece un patrón de cicatrización diferente.

Tras el estudio de los histogramas se evidencia una mejora porcentual de los efectos de la naringina sola o combinada no sólo en las tibias, sino también en la mandíbula y maxilar superior, mostrando una concordancia positiva, independientemente de su localización anatómica. También observamos que la mandíbula y maxilar superior son buenas regiones para este tipo de estudio experimental, ya que los resultados han sido paralelos a los obtenidos en otras regiones tradicionalmente más utilizadas, como es el caso de las tibias. Por otro lado, la amalgama resultante de la mezcla de naringina y colágeno fue la que obtuvo la mejor puntuación porcentual (85% positivos-15% score 0) frente a naringina sola (71% positivos-29% score 0) y la mezcla de naringina y extracto de uva (62% positivos, 38% score 0), lo que indica la necesidad de realizar más estudios utilizando naringina y colágeno, en comparación con el uso de la naringina sola. Si bien en este estudio se realizó transcurrido un tiempo de 6 meses, consideramos que es necesario realizar más estudios que evalúen el impacto densitométrico que ocurre en el lecho óseo en distintos tiempos, más reducidos. Una vez vistos los efectos porcentuales positivos, se aconseja realizar más estudios con naringina, bien sola o combinada, no sólo en tibias, especialmente también sobre la mandíbula, para ver si los resultados obtenidos con la combinación de naringina y extracto de uva han sido distintos por el lugar de aplicación o por el efecto de la combinación del biomaterial en sí. A nivel clínico sería interesante, una vez se hayan realizado más estudios, introducir la naringina como biomaterial debido a sus efectos biológicos positivos, ya contrastados. A ello se le suma su fácil obtención y bajo coste económico. En caso de que fuera posible su aplicación clínica en seres humanos, la mejora densitométrica una vez colocado este biomaterial se traduciría en una mejora en el pronóstico implantológico, ya que la disminución de la densidad es un factor que afecta negativamente en el protocolo quirúrgico y en el pronóstico.



## **VI CONCLUSIONES**



1. La microtomografía computerizada es una técnica adecuada para evaluar los cambios densitométricos tras la realización de defectos óseos quirúrgicos, existiendo correlación entre los aspectos morfológicos y los datos densitométricos.

2. En nuestro modelo, el tratamiento con naringina favoreció la neoformación ósea en los defectos, siendo la combinación más efectiva, la formada por naringina y colágeno.

3. Probablemente, no hayamos observado mayores diferencias entre los distintos grupos experimentales debido a que el periodo de estudio fue relativamente largo.



## **VII BIBLIOGRAFÍA**



Abades M, Rayon E. El envejecimiento en España: ¿un reto o problema social?. *Gerokomos*. 2012; 23(4):151-155.

Abdel IT, Abdel AA. Hesperidin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2009 Jun; 21(2): 175-184.

Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 1998; 139: 663-670.

Agrawal YO, Sharma PK, Shrivastava B, et al. Hesperidin Produces Cardioprotective Activity via PPAR- $\gamma$  Pathway in Ischemic Heart Disease Model in Diabetic Rats. Das A, ed. *PLoS ONE*. 2014; 9(11):e111212.

Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002; 18(1): 75-81.

Ailsa W, Hardcastle AC. The Effects of Flavonoids on Bone. *Current Osteoporosis Reports*. 2014 Jun; Volume 12, Issue 2, pp 205-210.

Alam MA, Kauter K, Brown L. Naringin Improves Diet-Induced Cardiovascular Dysfunction and Obesity in High Carbohydrate, High Fat Diet-Fed Rats. *Nutrients*. 2013; 5(3): 637-650.

Alam, M. Ashraful et al. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. *Advances in Nutrition*. 2014; 5(4): 404–417.

Al Pearce, RG Richards, S Milz, E Schneider and SG Pearce. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European Cells and Materials*. 2007; 13: 1-10.

Alberto MR, Moreno MI, Zampini IC, Isla M. Actividad antiinflamatoria de flavonoides naturales estructuralmente relacionados. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA)*. 2007; 6(6): 313–314.

Albornoz A. Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 1980: 616 pp.

Alvarez JF. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*. 2009; 1(2): 98-209.

Álvarez N. Efectos saludables de flavonoides. Estudio experimental in vitro e in vivo. Directores: Vicente Ortega, Vicente; Alcaraz Baños, Miguel Universidad de Murcia. Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física. 2010, Tesis Doctoral.

Amado NG, Fonseca BF, Cerqueira DM, Neto VM, Abreu JG. Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sci.* 2011; 89(15–16): 545–554.

American Academy of Periodontology Position Paper. Dental Implants in Periodontal Therapy. *J Periodontol* 2000; 71(12): 1934-1942.

Andersson L. Dentin xenografts to experimental bone defects in rabbit tibia are ankylosed and undergo osseous replacement. *Dent Traumatol.* 2010 Oct; 26(5): 398-402.

Andrae-Marobela K, Ghislain FW, Okatch H, Majinda RRT. Polyphenols; a diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. *Curr Drug Metab.* 2013; 7: 392-413.

Ang ES, Yang X, Liu Q, Zheng MH, Xu J. Naringin abrogates osteoclastogenesis and bone resorption via the inhibition of RANKL-induced NF- $\kappa$ B and ERK activation. *FEBS Lett.* 2011 Sep 2; 585(17): 2755-2762.

Anuja GI, Latha PG, Suja SR, Shyamal S, Shine VJ, Sini S, Pradeep S, Shikha P, Rajasekharan S. Anti-inflammatory and analgesic properties of *Drynaria quercifolia* (L.) J. Smith. *J Ethnopharmacol.* 2010 Nov 11; 132(2): 456-460.

Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N. Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *J Nutr.* 2000; 130(9): 2243- 2250.

Attia SM. Abatement by naringin of lomefloxacin-induced genomic instability in mice. *Mutagenesis.* 2008 Nov; 23(6): 515-521.

Avila-Ortiz G, Elangovan S, Kramer KWO, Blanchette D, Dawson DV. Effect of Alveolar Ridge Preservation after Tooth Extraction: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Dental Research.* 2014; 93(10): 950-958.

Badúi S. Química de los alimentos. 3ª ed. Logman-Alhambra. México DF, México. 1996; 645 pp.

Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med.* 2011 Feb; 61(1): 76-85.

Ballester I, Camuesco D, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. *Ars Pharm* 2006; 47(1): 5-21.

Ballesteros J. V y Cols. Avances en biología ósea. *Rev Fac Med UN Col.* 1999; 47(4).

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3248S-3254S.

Bellido T, Vaibhav S, Paola DP. Effects of PTH on Osteocyte Function. *Bone.* 2013; 54(2): 250–257.

Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem.* 2008 Aug 13; 56(15): 6185-6205.

Bernales DM, Caride Facundo, Lewis A, Martin L. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2004; 23(2), 65-74

Bloebaum RD, Merrell M, Gustke K, Simmons M. Retrieval analysis of a hydroxyapatite-coated hip prosthesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1991; 267: 97-102.

Bloebaum RD, Ota DT, Skedros JG, Mantas JP. Comparison of human and canine external femoral morphologies in the context of total hip replacement. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 1149-1159.

Bocco A, Cuvelier M, Richard H, Berset C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 2123-2129.

Bonewald, Lynda F. The Amazing Osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2011; 26(2): 229–238.

Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res.* 2000; 14(8): 581-591.

Borrelli F, Romano B, Fasolino I et al. Prokinetic effect of a standardized yarrow (*Achillea millefolium*) extract and its constituent choline: studies in the mouse and human stomach. *Neurogastroenterol Motil.* 2012; 24(2): 164-171, e90.

Boskey, Adele L. Bone Composition: Relationship to Bone Fragility and Antiosteoporotic Drug Effects. *BoneKEy Reports*. 2013; 2: 447.

Bouchgua, M. et al. Use of routine clinical multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis – part II: bone mineral density assessment. *Osteoarthritis and Cartilage*, february 2009, Vol 17, Issue 2, 197-204.

Braddock, R.J. By-products of citrus fruits. *Food Technology*. 1995; 49:76-77.

Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Prótesis Tejido-Integrada. La oseointegración en la Odontología Clínica. Barcelona: Quintessence; 1999; 11-13.

Bruder, S y Fox, B. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res*. 1999; 367: S68-83.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR y Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*. 1996; 45: 371-386.

Cabrera A y March N. Flavonoides como agentes quimiopreventivos y terapéuticos contra el cáncer de pulmón. *Rev Esp Nutr Hum Diet*. 2012; 16(4): 143-153.

Campos-Esparza MdR, Torres-Ramos MA. Neuroprotection by natural polyphenols: molecular mechanisms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2010; 10(4): 269-277.

Capasso R, Borrelli F, Aviello G, Capasso F, Izzo AA. Inhibitory effect of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on rat gastric motility. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2008; 376(6): 407-414.

Capasso R, Aviello G, Romano B, Atorino G, Pagano E, Borrelli F. Inhibitory effect of quercetin on rat trachea contractility in vitro. *J Pharm Pharmacol*. 2009; 61(1): 115-119.

Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9(5): 641-650.

Cárdenas-Erosa RA et al. Relación de las unidades Hounsfield y Newtons con la oseointegración y la carga inmediata. *Rev Odontol Latinoam*, 2012;4(1):15-20

Cartaya O, Reynaldo I. Reseña bibliográfica. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 2001; 22(2): 5-14.

Castaneda S, Largo R, Calvo E, Rodriguez-Salvanes F, Marcos ME, Diaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. *Skeletal Radiol.* 2006 Jan; 35(1): 34-41.

Catalina C, Di Risio B, Callero F, Hidalgo A, Argibay P. Células mesenquimales de médula ósea, diferenciación y potencial reemplazo neuronal. *Medicina (Buenos Aires).* 2004; 64: 543-549.

Cavallaro J et al. Metodologías clínicas para conseguir estabilidad primaria en implantes dentales. *JADA*, Vol. 5 N1. Febrero 2010.

Céliz G, Daz M, Carina Audisio M. Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *J Appl Microbiol.* 2011 Jun 14.

Chanet A, Milenkovic D, Manach C, Mazur A, Morand C. Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection?. *J Agric Food Chem.* 2012; 60: 8809–8822.

Chávez González, Bertha. Santos Almeida, Izabel. Urzedo Queiroz, Roldão. Evaluación de la dureza del esmalte en dientes deciduos. *Kiru* 8(1), 2011

Chen H, Ward MH, Graubard BI, Heineman EF, Markin RM, Potischman NA, Russell RM, Weisenburger DD, Tucker KL. Dietary patterns and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Am J Clin Nutr.* 2002 Jan; 75(1): 137-144.

Chen LL, Lei LH, Ding PH, Tang Q, Wu YM. Osteogenic effect of *Drynariae rhizoma* extracts and Naringin on MC3T3-E1 cells and an induced rat alveolar bone resorption model. *Arch Oral Biol.* 2011 Dec; 56(12): 1655-1662.

Chen, Kuo-Yu et al. A Novel Porous Gelatin Composite Containing Naringin for Bone Repair. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM.* 2013; 2013: 283941.

Chiba H, Uehara M, Wu J, Wang X, Masuyama R, Suzuki K, Kanazawa K, Ishimi Y. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J Nutr.* 2003 Jun; 133(6): 1892-1897.

Choi YH, Jin GY, Guo HS et al. Silibinin attenuates allergic airway inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 427(3): 450-455.

Choudhary N, Bijjem KR, Kalia AN. Antiepileptic potential of flavonoids fraction from the leaves of *Anisomeles malabarica*. *J Ethnopharmacol.* 2011; 135(2): 238-242.

Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J Nutr.* 2007; 137(5): 1244.

Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, Thompson VP, Lemons JE. Review Basic. Research Methods and Current Trends of Dental Implant Surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Feb; 88(2): 579-596.

Concejo Cutoli, C.; Montesdeoca García, N. Carga inmediata en implantes dentales. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac, Barcelona*, v.27, n.5, p.255-269, oct. 2005.

Corona M et al. Principales factores causales del fracaso de los implantes dentales. *MEDISAN* 2015;19(11):4022.

Dajas F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J Ethnopharmacol.* 2012; 143(2): 383–396.

Damy SB, Camargo RS, Chammas R and Figueiredo LF. Aspectos fundamentais de experimentación animal, aplicaciones en cirugía experimental. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56(1): 103-111.

Danika L. Batiste et al. *Ex vivo* characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *OsteoArthritis and Cartilage* (2004) 12, 986-996.

Darby I, Chen ST, Buser D. Ridge preservation techniques for implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009; 24: 260-271.

Delgado-Calle J, Riancho JA. Mecanobiología celular y molecular del tejido óseo. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2013; 5(1): 51-56.

Dellán A et al. Aplicación de las Unidades Hounsfield en Tomografía Computerizada como herramienta diagnóstica de las lesiones intra-óseas del complejo maxilo-mandibular: estudio clínico de diagnóstico. *Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo.* 27(2): 100-11, mayo-ago 2015.

Delmas D, Xiao JB. Natural polyphenols properties: chemopreventive and chemosensitizing activities. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012; 12: 835.

Deng GF, Xu XR, Zhang Y, Li D, Gan RY, Li HB. Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013; 53: 296-306.

Di Carlo G, Autore G, Izzo AA et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol*. 1993; 45(12): 1054-1059.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F, Autore G. Effects of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. *Phytotherapy Res*. 1994; 8(1): 42-45.

Ding P, Tang Q, Chen L. Effects of naringin on proliferation, differentiation and matrix mineralization of MC3T3-E1 cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2009 Jul; 34(13): 1712-1716.

Divieti P. Recent Progress in Osteocyte Research. *Endocrinology and Metabolism*. 2013; 28(4): 255–261.

Domínguez Alonso et al. Descripción histológica de la regeneración ósea en cresta iliaca de conejos implantados con Nukbone a las 4, 8, 12 y 16 semanas. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. Diciembre 2007, nº 6.

Donado M. Anatomía implantológica. 1a edición. Editorial: Ars Médica. 2003

Drago ME. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2007 oct-dic; 38(4).

Emad Tawfik Daif, Effect of a Multiporous Beta-Tricalcium Phosphate on Bone Density Around Dental Implants Inserted Into Fresh Extraction Sockets, *Journal of Oral Implantology*. 2013;39(3):339-344.

Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 2004; 24: 851-874.

Escamilla C, Cuevas EY, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 2009 Marzo-Abril; 52(2).

Estrada-Reyes R, Ubaldo-Suarez D, Araujo-Escalona AG.

Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Ment, México*. 2012 oct; 35(5).

Fallahi F, Mehrdad R, Sanaz M. Citrus Flavonoid Naringenin Improves Aortic Reactivity in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 2012; 44(3): 382–386.

Fang R, Veitch NC, Kite GC, Porter EA, Simmonds MSJ. Enhanced profiling of flavonol glycosides in the fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*). *J Agric Food Chem*. 2013; 6: 3868-3875.

Favari L, Arce-Díaz C, Ortiz-Martínez J, Pablo-Pérez S, Soto C, Meléndez-Camargo ME. Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea]. 2013; 44.

Feldman E. Fruits and vegetables and the risk of stroke. *Nutr Rev*. 2001; 59: 24-27.

Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11: E47-51.

Fernández SP, Karim N, Mewett KN, Chebib M, Johnston GA, Hanrahan JR. Flavan-3-ol esters: new agents for exploring modulatory sites on GABA (A) receptors. *Br J Pharmacol*. 2012; 165(4): 965-977.

Ferrer J, Tovar I, Martínez P. Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿el futuro del metabolismo óseo?. *An Med Interna (Madrid)* [revista en la Internet]. 2002 Ago; 19(8): 5-8.

Flores Rentería, Miguel Angel y Ayala Ruiz, Alvaro. Efectos en la Remodelación Ósea Debido a la Aplicación de Tornillos en Fémur Proximal. *Ingenier. mecáni. tecnolog. desarroll*. 2012, vol.4, n.2, pp.43-50.

Fortes C, Forastiere F, Farchi S, Rapiti E, Pastori G, Perucci C. Diet and overall survival in a cohort of very elderly people. *Epidemiology*. 2000; 11: 440-445.

Fuentes Paredes, Flor et al. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: conejo. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2010.

Gadotti VM, Schmeling LO, Machado C et al. Antinociceptive action of the extract and the flavonoid quercitrin isolated from *Bauhinia microstachya* leaves. *J Pharm Pharmacol*. 2005; 57(10): 1345-1351.

Galati E.M et al. Effects of naringin on experimental ulcer in rats. *Phytomedicine*. 1998 Oct; 5(5): 361-366.

Gálvez J, Sánchez de Medina F, Jiménez J et al. Effect of quercitrin on lactose-induced chronic diarrhoea in rats. *Planta Med*. 1995; 61(4): 302-306.

García-Closas R, González CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999; 10(1): 71-75.

García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*. 2007 Feb; 557(2-3): 221-229.

Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson SE, Cramer DW. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer*. 2009; 124(8): 1918-1925.

Georgiev M, Alipieva K, Orhan I, Abrashev R, Denev P, Angelova M. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chem*. 2011; 128: 100-105.

Georgiev M, Pastore S, Lulli D, Alipieva K, Kostyuk V, Potapovich A, et al. *Verbascum xanthophoeniceum*-derived phenylethanoid glycosides are potent inhibitors of inflammatory chemokines in dormant and interferon-gamma-stimulated human keratinocytes. *J Ethnopharmacol*. 2012; 144: 754-760.

Georgiev V, Anthony A, Violeta T. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients*. 2014; 6(1): 391–415.

Gerritsen AE, Allen PF, Witter DJ, Bronkhorst EM, Creugers NH. Tooth loss and oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Health Qual Life Outcomes*. 2010 Nov 5; 8: 126.

Gharzouli K, Holzer P. Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringenin, apigenin and genistein. *Pharmacology*. 2004; 70(1): 5-14.

Giannuzzo A. et al. Extracción de naringina de *Citrus paradisi* L. estudio comparativo y optimización de técnicas extractivas. *Ciênc Tecnol Aliment, Campinas*. 2000 Aug; 20(2): 257-261.

Giannuzzo AN, Boggetti HJ, Nazareno MA, Mishima HT. Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*. *Phytochem Anal*. 2003 Jul-Aug; 14(4): 221-223.

Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol*. 1998; 255: E416-E421.

Giribone J, Catagnetto P. Osteonecrosis de los maxilares inducida por bifosfonatos: lo que el odontólogo debe saber hoy: pautas y protocolos. *Odontoestomatología*, Montevideo. 2013 mayo; 15(21).

Gomes A, Couto D, Alves A et al. Trihydroxyflavones with antioxidant and anti-inflammatory efficacy. *Biofactors*. 2012; 38(5): 378-386.

Gómez A, Pujols A, Savoini M, Sanz J, Nart J. Regeneración ósea guiada: Defectos óseos a tratar y tipos de injertos a utilizar. 2013; 2(1-2).

Gonçalves MJ, Rodrigues AM, Canhão H, Fonseca JE. Osteoporosis: from bone biology to individual treatment decision. *Acta Med Port*. 2013 Jul-Aug; 26(4): 445-455.

Gopinath K, Sudhandiran G. Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway. *Neuroscience*. 2012; 227: 134–143.

Groth T, Falk P, Miethke RR. Cytotoxicity of biomaterials-basic mechanisms and in-vitro test methods, a review. *Alternatives to Laboratory Animals*. 1995; 23: 790–799.

Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. Does longstanding nicotine exposure impair bone healing and osseointegration? An experimental study in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Nov;91(2): 918-923.

Guede D, González P, Caeiro JR.1.- Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 2013;5(1): 43-50.

Guerra R, José René et al. Factores de riesgo para alteraciones de la densidad mineral ósea en mujeres posmenopáusicas. *Rev. chil. obstet. ginecol.*, Santiago, v.80, n.5, p.385-393, agosto 2015.

Guo J, Xue C, Duan JA, Qian D, Tang Y, You Y. Anticonvulsant, antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components in vivo. *Phytomedicine*. 2011; 18(14): 1250-1254.

Gutiérrez-Merino C, López-Sánchez C, Lagoa R, Samhan-Arias AK, Bueno C, García-Martínez V. Neuroprotective actions of flavonoids. *Curr Med Chem*. 2011; 18(8): 1195-1212.

Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R and Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 2000; 86: E85–E90.

Habauzit V, Nielsen IL, Gil-Izquierdo A, Trzeciakiewicz A, Morand C, Chee W, Barron D, Lebecque P, Davicco MJ, Williamson G, Offord E, Coxam V, Horcajada MN. Increased bioavailability of hesperetin-7-glucoside compared with hesperidin results in more efficient prevention of bone loss in adult ovariectomised rats. *Br J Nutr.* 2009 Oct; 102(7): 976-984.

Habauzit V, Sacco SM, Gil-Izquierdo A, Trzeciakiewicz A, Morand C, Barron D, Pinaud S, Offord E, Horcajada MN. Differential effects of two citrus flavanones on bone quality in senescent male rats in relation to their bioavailability and metabolism. *Bone.* 2011 Nov;49(5):1108-1116.

Hameed, Abdul et al. Bone Disease in Multiple Myeloma: Pathophysiology and Management. *Cancer Growth and Metastasis.* 2014; 7: 33–42.

Hanrahan JR, Chebib M, Johnston GA. Flavonoid modulation of GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol.* 2011; 163(2): 234–245.

Hariprasath L, Raman J, Nanjian R. Gastroprotective effect of *Senecio candicans* DC on experimental ulcer models. *J Ethnopharmacol.* 2012; 140(1): 145-150.

Heim et al. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2002; 13: 572-584.

Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 1989 Jul; 3(9): 2042-2051.

Hernández Muñiz S, Mitjavila Casanovas M. Introducción a la tomografía computerizada. *Rev Esp Med Nucl.* 2006;25(3): 206-216.

Hernández, S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina.* 2006; 2(3): 252-256.

Herrera-Ruiz M, Zamilpa A, González-Cortázar M et al. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine.* 2011; 18(14): 1255-1261.

Hidalgo et al. Food Chemistry. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry.* 2010; 121(3): 691-696.

Hillman GG, Forman JD, Kucuk O, Yudelev M, Maughan RL, Rubio J, Layer A, Tekyi-Mensah S, Abrams J, Sarkar FH. Genistein potentiates the radiation effect on prostate carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(2): 382-390.

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U and Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001; 88: E14–E22.

HO, P. et al. Content of CYP3A4 inhibitors, naringin, naringenin and bergapten in grapefruit and grapefruit juice products. *Pharm Acta Helv.* 2000 Apr;74(4): 379-385.

Hodgson JM, Croft KD. Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2006; 86 (15).

Hofstaetter JG, Wang J, Yan J, Glimcher MJ. Changes in bone microarchitecture and bone mineral density following experimental osteonecrosis of the hip in rabbits. *Cells Tissues Organs.* 2006;184(3-4): 138-147.

Horcajada MN, Habauzit V, Trzeciakiewicz A, Morand C, Gil-Izquierdo A, Mardon J, Lebecque P, Davicco MJ, Chee WS, Coxam V, Offord E. Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strength in young and adult intact rats. *J Appl Physiol.* 2008 Mar; 104(3): 648-654.

Hosseinimehr SJ, Mahmoudzadeh A, Ahmadi A, Mohamadifar S, Akhlaghpour S. Radioprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by gamma-irradiation in human lymphocytes. *Mutagenesis.* 2009 May; 24(3): 233-235.

Huang WC, Liou CJ. Dietary acacetin reduces airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration by modulating eotaxin-1 and th2 cytokines in a mouse model of asthma. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012: 910520.

Huxley RR, Lean M, Crozier A, Neil HA. Oxford Fruit and vegetable Study Group, 2004. Effect of dietary advice to increase fruit and vegetable consumption on plasma flavonol concentrations: results from a randomised controlled intervention trial. *J. Epidemiol. Community Health.* 2004; 58: 288-289.

Infante-Cossío P, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D, García-Perla A, González-Padilla JD. Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales autólogos. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.* 2007 Feb; 29(1): 7-19.

Izzo AA, Di Carlo G, Mascolo N, Capasso F, Autore G. Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. *Phytotherapy Res.* 1994; 8(3): 179-181.

Jäger AK, Saaby L. Flavonoids and the CNS. *Molecules.* 2011; 16(2): 1471-1485.

Jagetia GC, Reddy TK. The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. *Mutat Res.* 2002 Aug 26; 519(1-2): 37-48.

Jagetia GC, Venkatesha VA, Reddy TK. Naringin, a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis.* 2003 Jul; 18(4): 337-343.

Jain AP, Siddharth P and Anamika S. Bone Morphogenetic Proteins: The Anomalous Molecules. *Journal of Indian Society of Periodontology,* 2013; 17(5): 583–586.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI y Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997; 64(2): 295-312.

Jar, Ana M. Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. *Revista argentina de microbiología.* 2014; 46(2): 77-79.

Jayaraj R, Deb U, Bhaskar AS, Prasad GB, Rao PV. Hepatoprotective efficacy of certain flavonoids against microcystin induced toxicity in mice. *Environ Toxicol.* 2007; 22(5): 472-479.

Jiang JR, Yuan S, Ding JF, Zhu SC, Xu HD, Chen T, et al. Conversion of puerarin into its 7-O-glycoside derivatives by *Microbacterium oxydans* (CGMCC 1788) to improve its water solubility and pharmacokinetic properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 81: 647-657.

Jiang R, Miyamoto A, Martz A et al. Retrochalcone derivatives are positive allosteric modulators at synaptic and extrasynaptic GABA (A) receptors in vitro. *Br J Pharmacol.* 2011; 162(6): 1326-1339.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res.* 1998 May; 13(5): 793-802.

Jilka RL, Brendon N and Robert SW. Osteocyte apoptosis. *Bone.* 2013; 54(2): 264–271.

Johannot L, Somerset SM. Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr.* 2006; 9(08): 1045-1054.

Johnson MH, De Mejia EG, Fan JF, Lila MA, Yousef GG. Anthocyanins and proanthocyanidins from blueberry-blackberry fermented beverages inhibit markers of inflammation in macrophages and carbohydrate-utilizing enzymes in vitro. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57: 1182-1197.

Jones QR, Warford J, Rupasinghe HP, Robertson GS. Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2012; 33(11): 602-610.

Joshi K, Ascherio A, Manson J, Stampfer M, Rimm E, Speizer F, Hennekens C, Spiegelman D, Willett W. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA*. 1999; 282: 1233-1239.

Julia J et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; 19: S66–S73.

Jung UJ and Sang RK. Effects of Naringin, a Flavanone Glycoside in Grapefruits and Citrus Fruits, on the Nigrostriatal Dopaminergic Projection in the Adult Brain. *Neural Regeneration Research*. 2014; 9(16): 1514–1517.

Kanaze FI, et al. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 2003 Sep 19; 33(2): 243-249.

Kandhare AD, Ghosh P, Bodhankar SL. Naringin, a flavanone glycoside, promotes angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis through modulation of inflammatory and growth factor expression in diabetic foot ulcer in rats. *Chem Biol Interact*. 2014 Aug 5; 219: 101-112.

Karim N, Curmi J, Gavande N et al. 2'-Methoxy-6-methylflavone: a novel anxiolytic and sedative with subtype selective activating and modulating actions at GABA (A) receptors. *Br J Pharmacol*. 2012; 165(4): 880-896.

Ke, Jia-Yu et al. The Flavonoid, Naringenin, Decreases Adipose Tissue Mass and Attenuates Ovariectomy-Associated Metabolic Disturbances in Mice. *Nutrition & Metabolism*. 2015; 12:1.

Keinan D, Yang S, Cohen RE, Yuan X, Liu T and Li YP. Role of regulator of G protein signaling proteins in bone. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2014; 19: 634–648.

Khalil MI and Sulaiman SA. The Potential Role of Honey and Its Polyphenols in Preventing Heart Diseases: A Review. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 2010; 7(4): 315–321.

Khoury F, *El Aumento de Hueso en Implantología*, Ed. Quintessence, 2010. Primera edición; 2-5.

Khurana, Sandhya et al. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. *Nutrients*. 2013; 5(10): 3779–3827.

Kim SM, Kang k, Jho EH et al. Hepatoprotective effect of flavonoid glycosides from *Lespedeza cuneata* against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Phytother Res*. 2011; 25(7): 1011-1017.

Kim JA, Jung YS, Kim MY, Yang SY, Lee S, Kim YH. Protective effect of components isolated from *Lindera erythocarpa* against oxidative stress-induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes. *Phytother Res*. 2011; 25(11): 1612-1617.

Kim JH, Park DK, Lee CH, Yoon DY. A new isoflavone glycitein 7-O-beta-D-glucoside 4"-O-methylate, isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans extract, inhibits EGF-induced mucus hypersecretion in the human lung mucoepidermoid cells. *Phytother Res*. 2012; 26(12): 1807-1812.

Kim YJ, Henkin J. Micro-computed tomography assessment of human alveolar bone: bone density and three-dimensional micro-architecture. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015 Apr;17(2): 307-313.

Kinoshita T, Lepp Z, Kawai Y, Terao J, Chuman H. An integrated database of flavonoids. *Biofactors*. 2006; 26(3).

Kitamura K, Takahira K, Inari M, Satoh Y, Hayakawa K, Tabuchi Y, Ogai K, Nishiuchi T, Kondo T, Mikuni-Takagaki Y, Chen W, Hattori A, Suzuki N. Zebrafish scales respond differently to in vitro dynamic and static acceleration: analysis of interaction between osteoblasts and osteoclasts. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2013; 166: 74-80.

Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL, Goumans MJ. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone*. 2003 Sep; 33(3): 362-371.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(3): 560.

Komori, Toshihisa. Functions of the Osteocyte Network in the Regulation of Bone Mass. *Cell and Tissue Research*. 2013; 352(2): 191–198.

Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids-Food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakł Hig*. 2014; 65 (2): 79-85.

Kulka M. The potential of natural products as effective treatments for allergic inflammation: implications for allergic rhinitis. *Curr Top Med Chem*. 2009; 9(17): 1611-1624.

Kumar S and Abhay KP. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013: 162750.

Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. *Biochem. Pharmacol*. 2005; 69: 395-406.

La VD, Tanabe S, Grenier D. Naringenin inhibits human osteoclastogenesis and osteoclastic bone resorption. *J Periodontal Res*. 2009 Apr; 44(2): 193-198.

Lago JH, Toledo-Arruda AC, Mernak M, Barrosa KH, Martins MA, Tibério IF, Prado CM. Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. *Molecules*. 2014 Mar 24; 19(3): 3570-3595.

Latarjet M, Ruiz, *Anatomía Humana*. Ed. Panamericana, 1997. Tercera edición; vol I, 5-6.

Leem E, Nam JH, Jeon MT, Shin WH, Won SY, Park SJ, Choi MS, Jin BK, Jung UJ, Kim SR. Naringin protects the nigrostriatal dopaminergic projection through induction of GDNF in a neurotoxin model of Parkinson's disease. *J Nutr Biochem*. 2014; 25: 801–806.

Lemus C, Leticia M, Almagro U y Claudia LC. Origen y evolucion de los implantes dentales. *Rev haban cienc méd*. 2009; 8(4): 0-0.

Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol*. 2007; 165(12): 1364-1371.

Levi F, Pasche C, Lucchini F, Bosetti C, Franceschi S, Monnier P, La Vecchia C. Food groups and oesophageal cancer risk in Vaud, Switzerland. *Eur J Cancer Prev*. 2000; 9: 257-263.

Li RR, Pang LL, Du Q, Shi Y, Dai WJ, Yin KS. Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010; 32(3): 364-370.

Li HF, Guan XY, Yang WZ et al. Antioxidant flavonoids from *Epimedium wushanense*. *Fitoterapia*. 2012; 83(1): 44-48.

Lippuner K. The future of osteoporosis treatment - a research update. *Swiss Med Wkly*. 2012 Jul 19; 142:w13624.

Liu T, Zhao J, Ma L, Ding Y, Su D. Hepatoprotective effects of total triterpenoids and flavonoids from *Vitis vinifera* L against immunological liver injury in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012: 969386.

LLuch N, Chimenos K, López J. Alimentos contra el cáncer oral. *Av Odontoestomatol*, Madrid. 2009; 25(3).

Lo, Kevin W.-H. et al. Studies of Bone Morphogenetic Protein Based Surgical Repair. *Advanced drug delivery reviews*. 2012; 64(12): 1277–1291.

Londoño J, Sierra J. Efecto de la hesperidina sobre la captación de HDL en células hepáticas y evaluación de hesperidina liposomal sobre la oxidación de LDL. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. *Sciencia Et Technica*. 2007; 13(33): 63-66.

Lucena S, Arocha Piñango C y Guerrero B. Fibronectina. Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. Maracaibo. Revisión. *Invest clín*. 2007 jun; 48(2).

Luis DA, Aller R. Papel de los flavonoides del té en la protección cardiovascular. *An Med Interna (Madrid)*. 2008 marz; 25(3).

Mabry T, Markham K, Thomas B. *The systematic identification on flavonoids*. Springer. Nueva York, EEUU. 1979; 354 pp.

Macedo CL, Vasconcelos LH, Correia AC et al. Spasmolytic effect of galeitin 3,6-dimethyl eter, a flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. *J Smooth Muscle Res*. 2011; 47(6): 183.

Majumdar, Soumyajit, and Ramesh Srirangam. Solubility, Stability, Physicochemical Characteristics and In Vitro Ocular Tissue Permeability of Hesperidin: A Natural Bioflavonoid. *Pharmaceutical research*. 2009; 26(5): 1217–1225.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(5): 727-747.

Mapara, Manjeet, Betsy Sara Thomas, and K. M. Bhat. Rabbit as an Animal Model for Experimental Research. *Dental Research Journal*. 2012; 9(1): 111–118.

Marriott, Ian. Apoptosis-Associated Uncoupling of Bone Formation and Resorption in Osteomyelitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013; 3: 101.

Martearena, María Rita. Estudios de síntesis enzimática de ramnósidos y oligosacáridos catalizadas por  $\alpha$ -L-ramnosidasas. Tesis presentada como parte de los requerimientos para la obtención del título de Doctor en Ciencias-Área Química. 2007.

Martin TJ. Historically Significant Events in the Discovery of RANK/RANKL/OPG. *World Journal of Orthopedics*. 2013; 4(4): 186–197.

Martin TJ. Bone Biology and Anabolic Therapies for Bone: Current Status and Future Prospects. *Journal of Bone Metabolism*. 2014; 21(1): 8–20.

Martínez M, Mastoby; Pacheco B, Andrea; Vargas V, Marlene. Evaluación histológica de biocompatibilidad y bioconducción del compuesto hidroxiapatita-lignina implantado en tibia de conejos. *Rev.MVZ Cordoba, Córdoba, v.14, n.1, p.1624-1632, Apr. 2009.*

Martínez CA y Ozols A. Biomateriales utilizados en cirugía ortopédica como sustitutos del tejido óseo. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol*. 2012; 77(2).

Martínez-González JM et al. Diseño de los implantes dentales: Estado actual. *Av Periodon Implantol*. 2002; 14, 3: 129-136.

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM y Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*. 2002; 17(6): 271-278.

Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med*. 2001; 51: 292-299.

Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009; 9(2): 61-71.

McAllister BS, Haghghat K. (2007). Bone augmentation techniques. *J Periodontol* 78:377-396.

Mediero, Aránzazu, and Bruce N. Cronstein. Adenosine and Bone Metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2013; 24(6): 290–300.

Merchán S et al. Evaluación de la densidad ósea: técnicas densitométricas. *Cient. Dent.* 2015; 12; 3: 179-186.

Mestre R, Sánchez MA, Berini L y Gay C. Estudio del grado de satisfacción en pacientes edéntulos totales tratados con implantes. *Avances en Periodoncia.* 2001; 13(2): 93-99.

Mikán V, José Fernando, William Darío Oliveros A. Osteoclastogénesis y enfermedades óseas. *Revista Med.* 2007 jul; 15(2): 261-270.

Miller FJ, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD and Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ. Res.* 1998; 82: 1298–1305.

Miller EG, Peacock JJ, Bourland TC, Taylor SE, Wright JM, Patil BS, Miller EG. Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. *Nutr Cancer.* 2008; 60(1): 69-74.

Misch C.E. *Implantología Contemporánea.* 3a edición. Editorial: Elsevier Mosby 2009, p5-21.

Miyazaki, Tsuyoshi, Fumiaki Tokimura, and Sakae Tanaka. A Review of Denosumab for the Treatment of Osteoporosis. *Patient preference and adherence.* 2014; 8: 463–471.

Mohammad Kamal, Lars Andersson, Rene Tolba, Alexander Bartella, Felix Gremse, Frank Hölzle, Peter Kessler and Bernd Lethaus. A rabbit model for experimental alveolar cleft grafting. *Journal of Translational Medicine* 2017,15:50.

Monje F. et al. Carga inmediata con implantes en maxilar superior. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.* 2007; 29: 4.

Montoya Mesa, Carolina, Ossa Henao, Edgar Alexander. Composición química y microestructura de la dentina de pacientes colombianos. *Revista Colombiana de Materiales.* 2013. N. 5 pp. 73-78

Morán JM. Modelos animales para el estudio de la respuesta inflamatoria sistémica y de nutrición parenteral. *Nutr Hosp.* 2007; 22(2).

Morand C et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 2011 Jan; 93(1): 73-80.

Morawietz H, Weber M, Rueckschloss U, Lauer N, Hacker A and Kojda G. Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 85: 1130–1135.

Moreno MJ, Douglas R, Camacho B, Sánchez MP. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soja desodorizado. *INCI, Caracas.* 2004; 29(9): 532-538.

Mugge A, Brandes RP, Boger RH, Dwenger A, Bode-Boger S, Kienke S, Frolich JC and Lichtlen PR. Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. *J. CardioVasc. Pharmacol.* 1994; 24: 994–998.

Munevar JC, Becerra AP, Bermúdez C. Aspectos celulares y moleculares de las células madres involucrados en la regeneración de tejidos con aplicaciones en la práctica clínica odontológica. *Acta odontol venez, Caracas.* 2008; 46(3).

Munish Puri et al. Biochemical Basis of Bitterness in Citrus Fruit Juices and Biotech Approaches for Debittering. *Critical Reviews in Biotechnology.* 1996; 16(2): 145-155.

Myburgh, Kathryn H. Polyphenol Supplementation: Benefits for Exercise Performance or Oxidative Stress?. *Sports Medicine (Auckland, N.z.).* 2014; 44(1): 57–70.

Nappe Abaroa, CE, Montoya Bacigalupo, C, Estudio Comparativo del Efecto del Macrodiseño en la Estabilidad Primaria del Implante Oseointegrado. *Rev. Clin Periodoncia Implantol Rehabil. Oral Vol. 1 (1);* 2008.

Nart Molina, E. Marcuschamer Gittler J. Rumeu Milá A. Santos Alemany, T.J. Griffin. Preservación del reborde alveolar. Por qué y cuándo Periodoncia y Osteointegración 2007; 17 (No 4) Fasc. 11:229-237.

Natu S, Ali I, Alam, S, Giri Y, Agarwal A y Kulkarni V. The biology of distraction osteogenesis for correction of mandibular and craniomaxillofacial defects: A review. *Dental Research Journal.* 2014; 11(1): 16–26.

Navarro J et al. Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. Samsara Editorial, 2012.

Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone.* 1995; 16: 277S- 284S.

Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998; 18: 118-123.

Nicolle E, Souard F, Faure P, Boumendjel A. Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure-activity relationship. *Curr Med Chem.* 2011; 18(17): 2661-2672.

Norton MR, Gamble C. Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan. *Clin. Oral Impl. Res.* 2001; 12: 79–84.

Ocete MA, Gálvez J, Crespo ME et al. 1998. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. *Pharmacology.* 1998; 57(5): 261-270.

Otsuka F. Multifunctional bone morphogenetic protein system in endocrinology. *Acta Med Okayama.* 2013; 67(2): 75-86.

O'Brien CA, Tomoki N and Hiroshi T. Osteocyte Control of Osteoclastogenesis. *Bone.* 2013; 54(2): 258–263.

Palaska et al. Use of polyphenols in periodontal inflammation. *European Journal of Pharmacology.* 2013; 720: 77-83.

Palli D, Russo A, Ottini L, Masala G, Saieva, C, Amorosi A, Cama A, D'Amico C, Falchetti M, Palmirotta R, Decarli A, Constantini RM, Fraumeni Jr. Red meat, family history, and increased risk of gastric cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 2001; 61: 5415-5419.

Pang WY, Wang XL, Mok SK, Lai WP, Chow HK, Leung PC, Yao XS, Wong MS. Naringin improves bone properties in ovariectomized mice and exerts oestrogen-like activities in rat osteoblast-like (UMR-106) cells. *Br J Pharmacol.* 2010 Apr; 159(8): 1693-1703.

Park SE, Sapkota K, Kim S, Kim H, Kim SJ. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(3): 1008-1025.

Park MY, Ji GE, Sung MK. Dietary kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci.* 2012; 57(2): 355-363.

Pérez G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2003; 22 (1):48-57.

Peroti-Abad JA et al. Utilización de la microtomografía computerizada en la evaluación de la osteointegración de implantes dentales. RCOE 2015; 20(2): 115-121.

Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M and Ramirez-Vick J. Scaffold Design for Bone Regeneration. Journal of nanoscience and nanotechnology 2014; 14(1): 15–56.

Prasad S, Phromnoi K, Yadav VR, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. Planta Med. 2010; 76(11): 1044–1063.

Procházková D, Bousová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. 2011; 82(4): 513–523.

Pugliese AG, Tomas-Barberan FA, Truchado P, Genovese MI. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of Theobroma grandiflorum (Cupuassu) pulp and seeds. J Agric Food Chem. 2013; 61: 2720-2728.

Qi MY, Kai-Chen, Liu HR, Su YH, Yu SQ. Protective effect of Icaritin on the early stage of experimental diabetic nephropathy induced by streptozotocin via modulating transforming growth factor B1 and type IV collagen expression in rats. J Ethnopharmacol. 2011; 138(3): 731-736.

Quinones M, Alexandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr. Hosp, Madrid. 2012 feb; 27(1).

Ramírez J et al. Unidades Hounsfield como instrumento para la evaluación de la desmineralización ósea producida por el uso de exoprótesis. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N. 66. Marzo 2013.

Rani, Neha et al. Regulation of Heat Shock Proteins 27 and 70, P-Akt/p-eNOS and MAPKs by Naringin Dampens Myocardial Injury and Dysfunction In Vivo after Ischemia/Reperfusion. Ed. Rajesh Gopalrao Katare. PLoS ONE. 2013; 8(12): e82577.

Reynaga B, Susana N. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo: Utilidad clínica. Acta bioquím. clín. latinoam. 2009; 43(2): 177-193.

Richards RG, Stiffanic M, Owen GR, Riehle M, ap Gwynn I, Curtis AS. Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. Cell Biol Int. 2001; 25: 1237-1249.

Rivas JC, García M. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alim Nutri Salud*. 2002; 9(2): 31-38.

Rivera JA, Riaño C et al. Injertos óseos - Nueva alternativa. Fase III. Obtención, caracterización y evaluación de Hidroxiapatita Sintética y el compuesto de Hidroxiapatita Sintética porosa-Proteínas Morfogenéticas Óseas en un modelo experimental Lapino. *Rev Col Cienc Pec*. 2004; 17:1.

Roberts T and Andrew R. Bone Grafts, Bone Substitutes and Orthobiologics: The Bridge Between Basic Science and Clinical Advancements in Fracture Healing. *Organogenesis*. 2012; 8(4): 114–124.

Rodríguez E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioetn*. 2007; 13(1): 25-40.

Rogério AP, Dora CL, Andrade EL et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded micro-emulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol Res*. 2010; 26(9): 1375-1380.

Rojas P, Perea A, Ortiz C. Determinación por HPLC de flavanonas en jugos cítricos de variedades cultivadas en Santander. *Scientia Et Technica*. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. 2007 Abril; 23(33): 293-294.

Rudert, Maximilian. Histological Evaluation of Osteochondral Defects: Consideration of Animal Models with Emphasis on the Rabbit, Experimental Setup, Follow-Up and Applied Methods *Cells Tissues Organs* 2002; 171: 229–240.

Russo, Ricardo O y Speranza M. Los flavonoides en la terapia cardiovascular.. *Rev. costarric. cardiol*. 2006: 8(1): 13-18.

Saha, Suparna Ganguly et al. Effectiveness of Various Endodontic Irrigants on the Micro-Hardness of the Root Canal Dentin: An in Vitro Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR* 11.4 (2017): ZC01–ZC04.

Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev*. 2014 Jul; 8(16): 122-146.

Saletta JM, Rodríguez FJ, De la Plaza A. Actualización en preservación de cresta alveolar. Revisión de la literatura. *Cient. Dent*. 2014; 11; 2: 83-92.

Salgado J, Zea DM, González JM, Velosa J. Efectividad de las técnicas de preservación alveolar sobre alvéolos postexodoncia comparados con alvéolos sin preservar. Revisión sistemática de la literatura. *Univ Odontol.* 2014 Ene-Jul; 33(70): 203-216.

Salmah Y, Hasanah MG, Gan Sk. Naringin content in local citrus fruits. 1990; 37(2): 113-121.

Sánchez M.A. et al . Revisión bibliográfica de Implantología Bucofacial del año 2011: Primera parte. *Avances en Periodoncia*, Madrid. 2013 abr; 25(1).

Sankari SL, Babu NA, Rani V, Priyadharsini C, Masthan KMK. Flavonoids – Clinical effects and applications in dentistry: A review. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences.* 2014; 6(Suppl 1):S26-S29.

Sano T, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H. and Utsumi, H. Oxidative stress measurement by in Vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 1998; 41: 1355–1360.

Sauk JJ and Somerman MJ. Physiology of Bone: Mineral Compartment Proteins as Candidates for Environmental Perturbation by Lead. *Environmental Health Perspectives.* 1991; 91: 9–16.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005; 45(4): 287-306.

Schroeter H, Holt RR, Orozco TJ, Schmitz HH, Keen CL. Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature.* 2003; 426: 787-788

Shahzad O. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. Mechanisms and Clinical Implications. *Iranian Journal of Kidney Diseases.* 2011 Sep; 5(5).

Shi Y, Wu D, Sun Z et al. 2012. Analgesic and uterine relaxant effects of isoliquiritigenin, a flavone from *Glycyrrhiza glabra*. *Phytother Res.* 2012; 26(9): 1410-1417.

Sikavitsas VI, Temenoff JS y Mikos, AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials.* 2001; 22(19): 2581-2593.

Singh et al. Flavones: An important Scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2014; 84: 206-239.

Soto S, Guadalupe M. Injertos óseos. Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial. *Rev Cubana Estomatol.* 2005; 42(1). Ciudad de La Habana ene-abr. 2005.

Sroga GE and Deepak V. Effects of Bone Matrix Proteins on Fracture and Fragility in Osteoporosis. *Current Osteoporosis Reports.* 2012; 10(2): 141–150.

Suárez D. Principios básicos en regeneración ósea guiada. *Acta bioclínica.* 2012 enero-junio; 2(3).

Suzuki H, Swei A, Zweifach BW and Schmid-Schonbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension.* 1995; 25: 1083–1089.

Suzuki Y, Ishihara M, Segami T, Ito M. Anti-ulcer effects of antioxidants, quercetin, alpha-tocopherol, nifedipine and tetracycline in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1998; 78(4): 435-441.

Taheri R, Connolly BA, Brand MH, Bolling BW. Underutilized chokeberry (*Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia*, *Aronia prunifolia*) accessions are rich sources of anthocyanins, flavonoids, hydroxycinnamic acids, and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem.* 2013; 61: 8581-8588.

Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci (Landmark Ed.)* 2011; 16: 21-30.

Takahashi N, Naoyuki U and Tatsuo S. Vitamin D Endocrine System and Osteoclasts. *BoneKEy Reports.* 2014; 3: 495.

Tanaka, Toshio, and Ryo Takahashi. Flavonoids and Asthma. *Nutrients.* 2013; 5(6): 2128–2143.

Tang DQ, Wei YQ, Yin XX et al. In vitro suppression of quercetin on hypertrophy and extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells cultured by high glucose. *Fitoterapia.* 2011; 82(6): 920-926.

Tatay Díaz A et al. Sustitutos óseos. *Rev S And Traum y Ort.* 2008; 26(1/2): 2-13.

Tenorio FA, Del Valle L, Pastelin G. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica?. *Arch Cardiol Méx, México.* 2006 dic; 76(4).

Teti A. Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporosis Rep.* 2011; 9: 264–273.

Tomás-Barberán FA and Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000; 80: 1073-1080.

Vagaská B, Bacáková L, Filová E, Balík K. Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiol Res*. 2010; 59: 309-322.

Vance TM, Su J, Fontham ET, Koo SI, Chun OK. Dietary antioxidants and prostate cancer: a review. *Nutr Cancer*. 2013; 65(6): 793-801.

Veitch N. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 2011 Agost; 28 (10).

Vergara JJ, Ferrer Y, Morejón Y. Injerto libre de peroné en el tratamiento de defectos óseos. *Panorama Cuba y Salud*. 2012; 7(2) :8-14.

Villarreal M, Alvarez MA, Marichi FJ. Expresión de la osteocalcina en el ligamento periodontal al inducir fuerzas ortodóncicas. *Rev Odont Mex*. 2013 sept; 17(3).

Vinardell MP. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: Situación actual. *Acta bioeth*. 2007 jun; 13(1).

Vincent Y. 1962. Chemurgy of citrus peel. *Fruits*. 1962; 17: 451-455.

Visnagri, Asjad et al. Effect of Naringin on Hemodynamic Changes and Left Ventricular Function in Renal Artery Occluded Renovascular Hypertension in Rats. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2015; 7(2): 121–127.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan; 12(1):17-25.

Wallace TC. Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv Nutr*. 2011; 2(1): 1-7.

Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang Y, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL. *J. Natural Product*. 1999; 62: 294-296.

Wang X, Zhen L, Zhang G, Wong MS, Qin L, Yao X. Osteogenic effects of flavonoid aglycones from an osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei*-An in vitro efficacy study. *Phytomedicine*. 2011 Jul;18(10): 868-872.

Watanabe M, Cassiane D, Fernandes M. Instrumental and ethical aspects of experimental research with animal models. *Rev Esc Enferm USP*. 2014; 48 (1):177-183.

Wei M, Yang Z, Li P, Zhang Y, Sse WC. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. *Am J Chin Med*. 2007; 35(4): 663-667.

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*. 1998 Jul 15; 102(2): 274-282.

Weitzmann, M. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunosteletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica* 2013: 125705.

Welch A, MacGregor A, Jennings A, Fairweather-Tait S, Spector T, Cassidy A. Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women. *J Bone Miner Res*. 2012 Sep;27 (9):1872-1878.

Wightman JD, Heuberger RA. Effect of grape and other berries on cardiovascular health. *J Sci Food Agric*. 2014 Aug 29.

Wilson, C.G. et al. Advanced BMP Gene Therapies for Temporal and Spatial Control of Bone Regeneration. *Journal of Dental Research*. 2013; 92(5): 409–417.

Wong RW, Rabie AB. Effect of naringin on bone cells. *J Orthop Res*. 2006 Nov; 24(11): 2045-2050.

Wong RW, Rabie AB. Effect of naringin collagen graft on bone formation. *Biomaterials*. 2006 Mar;27 (9): 1824-1831.

Wood N. The effects of dietary bioflavonoid (rutin, quercetin, and naringin) supplementation on physiological changes in molar crestal alveolar bone-cemento-enamel junction distance in young rats. *J Med Food*. 2004 Summer; 7(2): 192-196.

Wood N. The effects of dietary naringenin supplementation on physiological changes in molar crestal alveolar bone-cemento-enamel junction distance in young rats. *J Med Food*. 2005; 8(1): 31-35.

Wu JB, Fong YC, Tsai HY, Chen YF, Tsuzuki M, Tang CH. Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jul 7; 588(2-3): 333-341.

Xiao JB. Polyphenol-plasma proteins interaction: its nature, analytical techniques, and influence on bioactivities of polyphenols. *Curr Drug Metab* 2013;14: 367-368.

Xiao, Yang et al. Naringin Administration Inhibits Platelet Aggregation and Release by Reducing Blood Cholesterol Levels and the Cytosolic Free Calcium Concentration in Hyperlipidemic Rabbits. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2014; 8(3): 968–972.

Xu SL, Choi RC, Zhu KY et al. 2012. Isorhamnetin, a flavonol aglycone from *Ginkgo biloba* L., induces neuronal differentiation of cultured PC12 cells: potentiating the effect of nerve growth factor. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012: 278273.

Y. Hao et al. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. *Bone* 41 (2007) 631–638.

Yan RY, Cao YY, Chen CY et al. 2011. Antioxidant flavonoids from the seed of *Oroxylum indicum*. *Fitoterapia.* 2011; 82(6): 841-848.

Yang T, Luo F, Shen Y et al. 2012. Quercetin attenuates airway inflammation and mucus production induced by cigarette smoke in rats. *Int Immunopharmacol.* 2012; 13(1): 73-81.

Yasuda, Hisataka. RANKL, a Necessary Chance for Clinical Application to Osteoporosis and Cancer-Related Bone Diseases. *World Journal of Orthopedics.* 2013; 4(4): 207–217.

Yilma, Abebayehu N. et al. Flavonoid Naringenin: A Potential Immunomodulator for *Chlamydia Trachomatis* Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2013 (2013): 102457.

Yin, Lihua et al. Effects of Naringin on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells In Vitro and In Vivo.” *Stem Cells International* 2015 (2015): 758706.

Yu, Xiaowei et al. Inhibiting Wear Particles-Induced Osteolysis with Naringin. *International Orthopaedics.* 2013; 37(1): 137–143.

Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC and Diez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000; 35: 1055–1061.

Zanchetta JR, Talbot JR. Osteoporosis: fisiopatología, diagnóstico, prevención y tratamiento. Ed. Médica Panamericana, 2001.P17.

Zhang P, Dai KR, Yan SG, Yan WQ, Zhang C, Chen DQ, Xu B, Xu ZW. Effects of naringin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cell. *Eur J Pharmacol.* 2009 Apr 1; 607(1-3): 1-5.

Zhang LM, Yao JZ, Li Y et al. Anxiolytic effects of flavonoids in animal models of posttraumatic stress disorder. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012: 623753.

Zhang XH, Ma ZG, Rowlands DK et al. Flavonoid myricetin modulates GABA (A) receptor activity through activation of Ca (2+) channels and CaMK-II pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 758097.

Zheng XK, Zhang L, Wang WW, Wu YY, Zhang QB, Feng WS. Anti-diabetic activity and potential mechanism of total flavonoids of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in rats induced by high fat diet and low dose STZ. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137(1): 662-668.

Zofkova I. Bone tissue as a systemic endocrine regulator. *Physiol Res.* 2014. Dec 3.

Zwingenberger, Stefan et al. Recommendations and Considerations for the Use of Biologics in Orthopedic Surgery. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy.* 2012; 26(4): 245–256.

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Tablas

Tabla 1. Perfil de densidad por grupo de lesión (Dellán A et al., 2015)

Tabla 2. Medidas de densidad (Norton Mr et al., 2001)

Tabla 3. Clasificación según Norton y Gamble clasificación basada en el análisis óseo por medio de Tomografía Computerizada (TC) y las unidades Hounsfield (HU).

Tabla 4. Ejemplos de flavonoides, su estructura y parte de sustitución (Cartaya y Reynaldo, 2001)

Tabla 5. Ejemplo concentraciones naringina naringina (Alam et al., 2014)

Tabla 6. Distribución conejos y lugares inserción biomaterial

Tabla 7. Score naringina

Tabla 8. Score naringina+colágeno

Tabla 9. Score naringina+extracto de uva

### Figuras

Figura 1. Abeja polinizando. Web imágenes <https://es.fotolia.com> ID de contenidos: 103327303 Fecha de la compra: 21-04-2017

Figura 2. Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo (Escamilla et al., 2009)

Figura 3. Diferentes tipos de flavonoides según la estructura (Martínez-Flórez et al., 2002)

Figura 4. Mandarinas. Web imágenes <https://es.fotolia.com> ID de contenidos: 89159472 Fecha de la compra: 21-04-2017

Figura 5. Pomelos. Web imágenes <https://es.fotolia.com>. ID de contenidos: 58624784 Fecha de la compra: 21-04-2017

Figura 6. Estructura naringina y comparación con otros flavonoides (Lago, 2014)

Figura 7. Escáner multimodal SPET/CT

Figura 8. Afeitado del campo quirúrgico

Figura 9. Asepsia del campo quirúrgico

Figura 10. Incisión cutánea

Figura 11. Exposición del hueso

Figura 12. Perforación de la cortical

Figura 13. Segundo lecho ya preparado

Figura 14. Depósito naringina

Figura 15. Sutura

Figura 16. Extracción incisivo central superior

Figura 17. Adquisiciones mediante microtomografía computerizada

- Figura 18. Imagen pata derecha conejo 5153 mediante Volview
- Figura 19. Tibia derecha conejo 5153, orificio superior (Amide)
- Figura 20. Tibia derecha conejo 5153, orificio inferior (Amide)
- Figura 21. Maxilar (Volview)
- Figura 22. Mandíbula (Volview)
- Figura 23. Mandíbula 5353, localización incisivo contralateral
- Figura 24. Mandíbula 5353, localización zona defecto
- Figura 25. Maxilar 5353, incisivo contralateral
- Figura 26. Maxilar 5353, localización zona defecto
- Figura 27. Líneas en corte coronal que atraviesan la zona del defecto
- Figura 28. Líneas en corte transversal que atraviesan la zona del defecto, maxilar
- Figura 29. Líneas en corte transversal que atraviesan la zona del defecto, mandíbula
- Figura 30. Escala densitométrica zona cortical
- Figura 31. Escala densitométrica zona defecto
- Figura 32. Línea que atraviesa la cortical de la tibia
- Figura 33. Línea que atraviesa la zona del defecto
- Figura 34. Histograma tibia
- Figura 35. Tibia sujeto 5353