



Caracterización microscópica de matrices óseas nacionales para la reconstrucción de estructuras óseas perdidas en Odontología

Microscopic characterization of national bone matrices for the reconstruction of lost bone structures in Dentistry

Francia Catalina M¹, Battisti María Eugenia¹, Oliva Marco², Bachur Ricardo¹

¹Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. Facultad de Odontología. Departamento de Patología Bucal

²Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación

Abstract

Objective. Morphologically characterize the ultrastructure of some nationally manufactured bone matrices available in the local commercial market in order to determine the main characteristics that allow their use in the dental rehabilitation of atrophic bone ridges. **Methods.** Bone matrices from Freeze-Dried Human Bone (HHL) provided by the Laboratory of Blood Products of the National University of Córdoba were studied, with block and powder format whose particle size is from 200 to 1000 μm and in the form of fine granules of 1000 at 2000 μm . The samples were respectively metalized with a layer of gold or chromium and were analyzed in a scanning electron microscope (SEM). **Results.** A structure of HHL bone similar to that observed in the spaces of the Haversian blood vessel system of normal human bone was observed. **Conclusions.** The structural findings of the HHL bone, similar to those observed in the spaces of the Haversian blood vessel system of normal human bone, guarantee the topographic conservation responsible for the increase of the surface area and consequently a large surface-volume ratio that favors repair and regeneration. Bone with favorable characteristics is used as a graft. In addition, maintaining the nanostructure of the extracellular matrix gives it greater roughness, allowing greater anchorage that favors better cell growth by presenting essential topographic signals, benefiting adhesion, proliferation and differentiation of cells.

KEY WORDS: scanning electron microscope, bone matrix, rehabilitation

Resumen

Objetivo. caracterizar morfológicamente la ultra estructura de algunas matrices óseas de fabricación nacional disponibles en el mercado comercial local a fin de determinar las principales particularidades que permitan su uso en la rehabilitación odontológica de los rebordes óseos atróficos. **Métodos.** Se estudiaron matrices óseas provenientes de Hueso Humano Liofilizado (HHL) provistas por el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba, con formato de bloque y de polvo cuyo tamaño de partícula es de 200 a 1000 μm y en forma de gránulos finos de 1000 a 2000 μm . Las muestras se metalizaron respectivamente con una capa de oro o cromo y fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (MEB). **Resultados.** Se observó una estructura del hueso HHL similar a los observados en los espacios del sistema de vasos sanguíneos Haversiano del hueso humano normal. **Conclusiones.** Los hallazgos estructurales del hueso HHL, similares a los observados en los espacios del sistema de vasos sanguíneos Haversiano del hueso humano normal, garantizan la conservación topográfica responsable del incremento del área superficial y consecuentemente de una gran relación superficie-volumen que favorece la reparación y regeneración ósea constituyendo características favorables para ser utilizadas como injertos. Además, el mantenimiento de la nanoestructura de la matriz extracelular le otorga mayor rugosidad, permitiendo un mayor anclaje que favorece un mejor crecimiento celular por presentación de señales topográficas esenciales, beneficiando la adhesión, proliferación y diferenciación de las células.

PALABRAS CLAVE: microscopia de barrido, matriz ósea, rehabilitación

Received 26 March 2020; Received in revised form 20 May 2020; Accepted 10 July 2020

Introducción

El hueso alveolar es una estructura odonto-dependiente, se forma junto con los elementos dentarios, les da sostén mientras cumplen su función y se reabsorbe una vez que los dientes se pierden¹. Esta es una de las razones que explican porque luego de extracciones dentarias únicas o múltiples, traumatismos, o como resultado de secuelas oncológicas e infecciosas, el remanente óseo de los maxilares es insuficiente para una adecuada rehabilitación². A lo expuesto se suma que en la actualidad se ha modificado sustancialmente la estructura de la pirámide poblacional, acrecentándose el rango de edad de las personas y consecuentemente la acumulación del daño³

La Odontología actual se vale de diversas estrategias rehabilitadoras, entre las que se encuentran el uso de matrices en técnicas de injertos óseos. Uno de los puntos claves en la regeneración tisular es el desarrollo de estructuras tridimensionales que sustituyan total o parcialmente la estructura perdida, y/o, actúen como vehículo y soporte para transportar células y moléculas. Para ser calificado como injerto óseo un material debe poseer al menos una de estas tres funciones: osteogénesis, (capacidad de estimular a las células óseas como preosteoblastos y osteoblastos para establecer centros de formación y crecimiento óseo), osteoinducción (inducción de la diferenciación de las células mesenquimales pluripotenciales permitiendo la neoformación ósea a nivel del injerto y del lecho receptor) u osteoconducción (aptitud para crear un soporte estructural para la neoformación ósea).

El tejido óseo puede ser considerado, desde el punto de vista de la ciencia de materiales, como una sustancia compuesta formada por dos fases principales; una fase inorgánica, que ocupa alrededor del 70% en peso y una fase orgánica, que ocupa alrededor del 22%. La fase inorgánica, a su vez, está formada por cristales microscópicos de fosfato de calcio, siendo la hidroxiapatita (HAp) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ el componente más importante, mientras que la fase orgánica está compuesta principalmente por fibras de colágeno. La estructura jerárquica del hueso a regenerar puede describirse a distintas escalas de longitud a nivel de lupa, macroscópicamente, distinguimos el hueso compacto o cortical, donde se aprecia

una matriz densa sin presencia de oquedades, y, el hueso esponjoso en el que se reconocen numerosas cavidades ocupadas por vasos sanguíneos y elementos hematopoyéticos. En la compacta la matriz extracelular se ordena en laminillas dispuestas de manera paralela o concéntrica alrededor de un canal (Canal de Havers) por el que discurren vasos y nervios, los osteocitos se encuentran entre las laminillas óseas y forman un conjunto denominado osteona o sistema de Havers, cuya dimensión puede describirse a escala microscópica (con dimensiones menores a 200 μm). Los canales de Havers están conectados mediante canales transversales denominados canales de Volkman. Los osteocitos emiten prolongaciones celulares a través de espacios denominados canalículos y así acceden a los vasos para obtener nutrientes. Las laminillas ($\sim 7 \mu\text{m}$) están compuestas por matriz calcificada, existiendo 4-20 laminillas por cada osteona. A escala nanométrica se pueden apreciar las fibras colágenas de la matriz que permiten el depósito alrededor de las fibras proteicas de la fase mineral formada por cristales de hidroxiapatita en forma de placas.

El hueso posee un asombroso potencial de regeneración, puede restaurar perfectamente su estructura original y sus propiedades mecánicas, pero esta capacidad tiene sus limitaciones y puede fallar en ciertas condiciones⁴. Entre algunos de los factores que impiden la reparación se encuentran: fallas en la vascularización o inestabilidad mecánica, por tanto, los biomateriales empleados como matrices además de poseer cualidades, como ser compatibles con el organismo, no generar rechazo ni daños, y, tener una determinada vida media para desarrollar su tarea, deben fundamentalmente ser lo suficientemente porosos para permitir la penetración celular, el crecimiento de tejido interno, una incursión vascular rápida que asegure el suministro de nutrientes. Su morfología entonces resulta clave ya que debe permitir guiar la formación de nuevo tejido óseo en formas anatómicamente relevantes.

Este trabajo surge en la necesidad de caracterizar morfológicamente la ultraestructura de algunas matrices óseas de fabricación nacional disponibles en el mercado comercial local a fin de determinar las principales particularidades que permitan su uso en la rehabilitación odontológica

de los rebordes óseos atroficos, de modo tal de seleccionar en base a evidencias científicas aquellos que incrementen las probabilidades de éxito del tratamiento y disminuyan los posibles riesgos y complicaciones durante las distintas etapas de la rehabilitación con una relación costo-beneficio- seguridad que sea conveniente para la población.

Material y Método

Se estudiaron matrices óseas provenientes de Hueso Humano Liofilizado (HHL) provistas por el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba, con formato de bloque y de polvo cuyo tamaño de partícula es de 200 a 1000 μm y en forma de gránulos finos de 1000 a 2000 μm . A los fines de valorar la influencia sobre las propiedades biológicas y físicas de la irradiación ionizante a la que se someten estas matrices para su inactivación viral y esterilización bacteriana y fúngica se evaluó el material en dos etapas de su procesamiento: una vez que las piezas han recibido el tratamiento previo al envasado primario (eliminación de tejido blando y cartílago del hueso, pre-lavado de las fracciones óseas, lavados oxidativos, deslipidizantes y deshidratantes, liofilización o secado en frío, dosificación y envasado bajo cabina de flujo laminar y rotulado) y posteriormente a la esterilización final por irradiación gamma, cuarentena post irradiación, control de calidad y empaque final.

Para el análisis comparativo se utilizó matriz ósea bovina de granulometría 250 a 1000 μm , Bio-Oss® de la firma Geistlich Pharma AG (Suiza) por ser uno de los biomateriales de injerto más ampliamente utilizados a escala internacional. Se trata de un hueso bovino desproteínizado, desmineralizado y esterilizado sometido a una calcinación (800 – 1200°C), que ha demostrado ser altamente biocompatible con tejidos duros orales en humanos y animales, además de cumplir con los criterios de ser un material osteoconductor, actuando como un andamio para la formación ósea.

Se realizaron observaciones a escala macroscópica, como, microscópica y nanométrica. Para la caracterización morfológica a partir de Microscopía Electrónica de Barrido

(MEB), tanto las partículas como los bloques fueron pegados en soportes metálicos usando adhesivo “doubleface” de carbono, identificando cada soporte. Las muestras se metalizaron respectivamente con una capa de oro o cromo y fueron analizadas en un equipo de barrido FE-SEM SIGMA marca Carl Zeiss en el Laboratorio de y Análisis por Rayos X LAMARX, ubicado en la Facultad de Matemática Astronomía y Física - Instituto de Física Enrique Gaviola (IFEG- Universidad Nacional de Córdoba -CONICET). Sobre las muestras de hueso, al momento de la observación se tomaron a diferentes magnificaciones tres repeticiones de cada una, tanto a escala micrométrica como a escala nanométrica.

Resultados

Macroscópicamente se observó cada particulado, el HHL (polvo granulado de 200 a 1000 μm) presentó partículas con un aspecto superficial homogéneo, equivalente al hueso control (Bio-Oss®). La textura superficial de las partículas de polvo varió desde rugosa hasta lisa. Se observó además una variación en la coloración siendo Bio-Oss® más blanco.

Descripción de la ultraestructura de las matrices

El análisis de las muestras a escala microscópica permitió la observación en la matriz Bio-Oss® (granulometría 250 a 1000 μm), de un particulado con presencia de formas regulares, (cúbicas o de paralelepípedo), con aristas definidas y cuyo tamaño de partículas estuvo en un rango de 152 a 600 μm (Fig. 1 A, B); se observó una morfología de superficie lisa, presentando un aspecto de arenado superficial homogéneo (Fig. 1 C). las observaciones permitieron la identificación de micro y macroporos dentro de un rango de diámetro de 40-500 μm (Fig.1).

El granulado de HHL exhibió partículas de características irregulares, de tamaños variables y bordes filosos con aristas agudas, (Fig. 2-A), cuyo tamaño promedio fue de 1000 μm en su eje mayor. (Fig. 2-B); una importante presencia de microporos en rango de 30 a 100 μm aproximadamente compatible con el sistema

haversiano del hueso (Fig. 2-C). Las muestras en formato de bloque de la matriz HHL tanto antes del proceso de irradiación como luego de su procesado, (Fig. 2 D-E), exhibieron macro y microporos interconectados en un rango de 30 a 400 μm .

A escala nanométrica la caracterización de la morfología buscó identificar las estructuras que forman parte de la matriz del hueso, este estudio se realizó tanto en la muestra control (Bio-Oss®), como en el caso del HHL donde el estudio se ejecutó en dos etapas de su procesado: antes y después de su exposición a la irradiación ionizante. Bio-Oss® exhibió una organización mineral a esta escala en forma de andamios (scaffold) similar a las fibras de colágeno (Fig 3 y 4) con presencia de nanoporos (Fig. 3 y 4). Nuestras observaciones del HHL nos permitieron confirmar a esta escala la presencia de una red nanofibrilar con sus dimensiones características de nanoestructura, que en este caso van de los 50 a 500 nm.

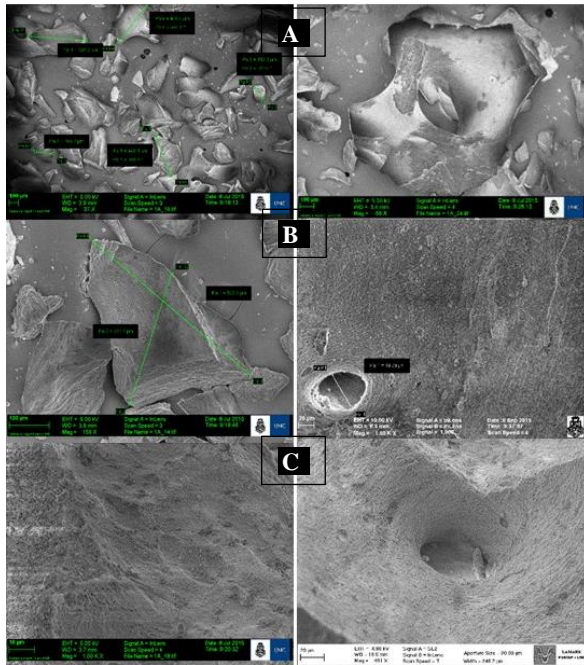


Figura 1. Matriz Ósea Bovina Bio-Oss® (granulometría 250 a1000 μm). **A-B-** MEB, dimensiones del particulado las líneas representan las mediciones realizadas en un rango de 152 a 600 μm , **C** MEB imagen de la superficie del gránulo de la matriz ósea nótese el aspecto de arenado superficial. *Der Sup-* Microfotografía MEB macroporo de 500 μm de diámetro. *Der Medio e Inferior.* Microfotografías MEB microporos 50- 64 μm .

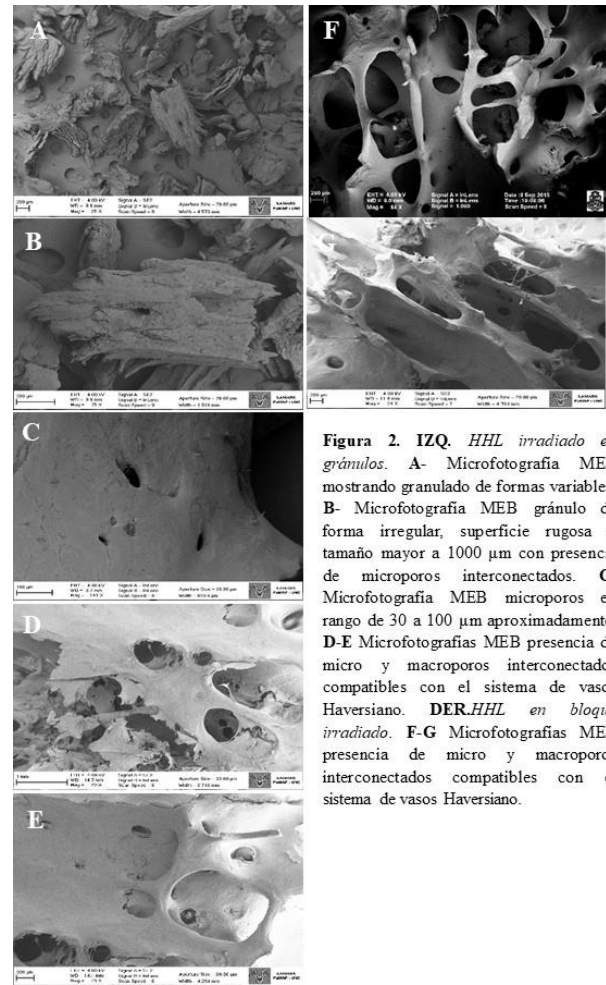


Figura 2. IZQ. HHL irradiado en gránulos. **A-** Microfotografía MEB mostrando granulado de formas variables. **B-** Microfotografía MEB gránulo de forma irregular, superficie rugosa y tamaño mayor a 1000 μm con presencia de microporos interconectados. **C-** Microfotografía MEB microporos en rango de 30 a 100 μm aproximadamente. **D-E** Microfotografías MEB presencia de micro y macroporos interconectados compatibles con el sistema de vasos Haversiano. **DER.HHL en bloque irradiado.** **F-G** Microfotografías MEB presencia de micro y macroporos interconectados compatibles con el sistema de vasos Haversiano.

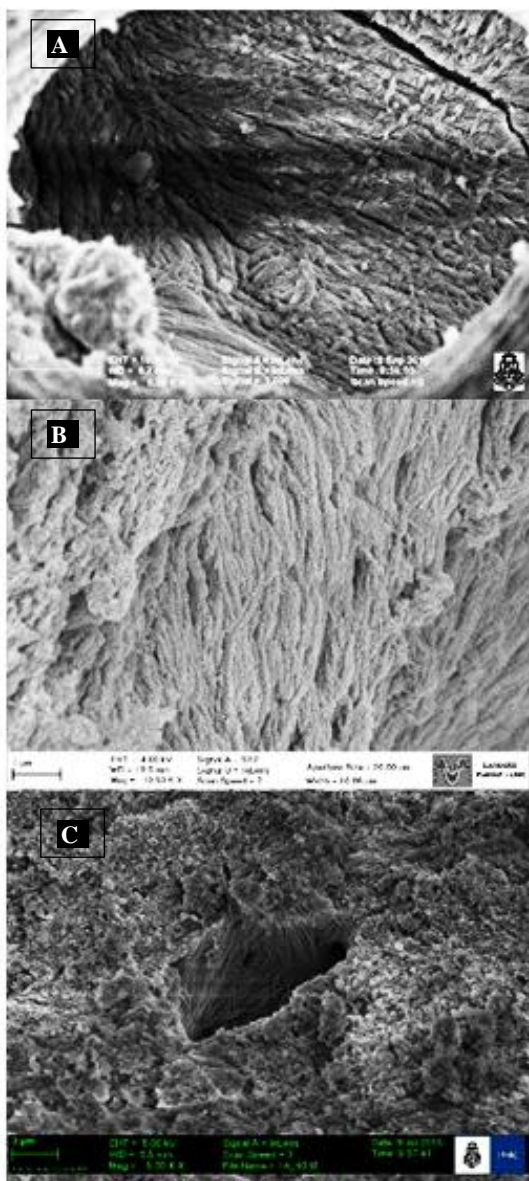


Figura 3. Matriz Ósea Bovina Bio-Oss® La microfotografía MEB mostró una organización andamio mineral similar a las fibras de colágeno (Superior y medio). Presencia de nanoporos (Inferior)

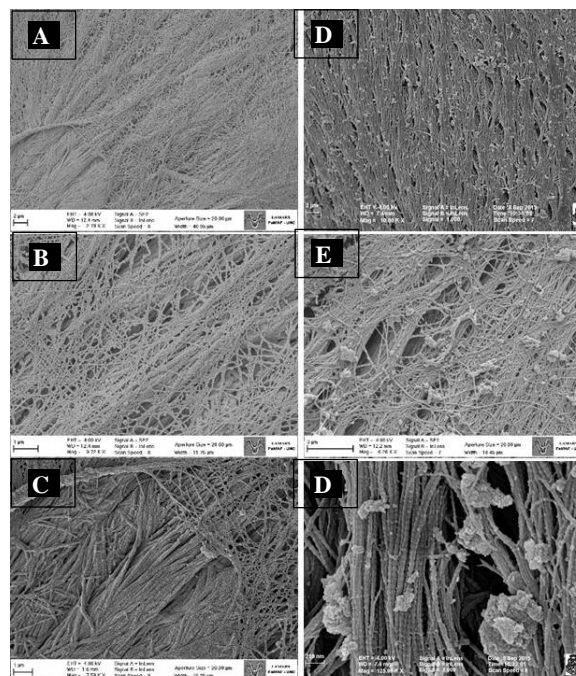


Figura 4. IZQ: *Hueso humano liofilizado no irradiado.* Microfotografía MEB muestra nanoporos (A-B-C) y presencia de una red nanofibrilar. DER. *Hueso humano liofilizado irradiado* Microfotografía MEB muestra la conservación de nanoporos (C-D-E) y presencia de una red nanofibrilar con sus dimensiones características de nanoestructura, que en este caso van de los 50 a 500 nm.

Discusión

La morfología superficial de los materiales de injerto óseo y la presencia de macroporos, afectan significativamente el tamaño del espacio interparticular y favorecen la osteoconducción en el reemplazo de defectos óseos grandes. Desde el año 1998 Brekke et al.⁴ han expresado que la conservación de las características estructurales internas y el mantenimiento la geometría tridimensional permitirá al biomaterial mantener el espacio planificado y/o diseñado por el clínico en forma y tamaño para que el tejido óseo posteriormente ocupe ese lugar. El análisis de las muestras a escala microscópica permitió la observación en la matriz de micro y macroporos integrando una estructura tridimensional de porosidad interconectada dentro de un rango de diámetro de 50-500 μm para el hueso control; y de 30 a 400 μm en la matriz HHL tanto antes del proceso de irradiación como luego de su procesado. Estas estructuras favorecen la estabilización de coágulos cuando se emplea en

técnicas de injerto, como el crecimiento de tejido óseo que se ve reforzado por la organización del andamio, además de beneficiar la revascularización asegurando la nutrición y la señalización para la migración de osteoblastos. Esto permite que el nuevo hueso laminar y la matriz se integren con éxito después de aproximadamente 6 meses, el injerto se incluye en el proceso natural de remodelación fisiológica y paulatinamente el sitio se remodela dando paso al hueso nuevo en el lecho injertado.

En la literatura consultada es posible obtener valiosa información con respecto a la relación existente entre la forma del granulado y como esta influye en sus propiedades como material de reemplazo del hueso perdido representando así un factor relevante para sus diferentes indicaciones. La morfología superficial influye de gran manera en la velocidad de reabsorción que presentarán las partículas, siendo fácilmente reabsorbibles los granulados con superficies rugosas y con gran cantidad de poros, debido a que poseen un área mayor de contacto con el medio circundante, en comparación a partículas de una superficie más lisa y con baja cantidad de poros. Las partículas más pequeñas, con mayores irregularidades, no se recomiendan en áreas periodontales ya que serían propensas a infecciones. Weibrich et al. 2000⁶, demostraron el efecto positivo de los poros que se pueden encontrar en estas partículas los cuales favorecen el crecimiento de capilares. Nuestro trabajo mostró diferencias significativas en este sentido, así a escala micrométrica, el granulado de HHL exhibió partículas de características irregulares, de tamaños variables y bordes filosos con aristas agudas, cuyo tamaño promedio fue de 1000 μm en su eje mayor y una importante presencia de microporos en rango de 30 a 100 μm aproximadamente compatible con el sistema haversiano del hueso; mientras que el control (Bio-Oss®) presentó partículas de forma regular, cúbica, o, de paralelepípedo, de aristas definidas y un tamaño de partículas en un rango de 152 a 600 μm observándose una morfología superficial lisa con un aspecto de arenado superficial homogéneo. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las diferencias en el proceso de fabricación y pueden influir en la respuesta biológica y clínica y deben ser tenidas en cuenta para su selección en diferentes procedimientos rehabilitadores.

El campo de la nanotecnología avanza rápidamente, está conduciendo a una rápida expansión y desarrollo en la fabricación de materiales que puedan desempeñar un papel activo en el proceso de regeneración en lugar de simplemente ser portadores de células o plantillas de tejido. Varios estudios in vitro han respaldado un aumento en la proliferación de osteoblastos en materiales a nanoescala como hidroxiapatita⁷. Es un hecho que las nanomorfologías revelan una mayor influencia en la adsorción de proteínas, proliferación y diferenciación de células de osteoblastos. In vivo, estas nanoestructuras han demostrado un mayor porcentaje de contacto óseo sin producir respuestas inflamatorias, los resultados de Rani et al 2012⁸ apuntan a la importancia de nanomorfologías específicas en el control de la integración tisular. Wang et al⁹ demostraron que la diferenciación de osteoblastos y la producción de factores locales estaban regulados tanto por la superficie de rugosidad como por la nanotopografía, lo que indica que las características estructurales del andamio pueden usarse para impulsar la diferenciación celular y crear un ambiente osteogénico sin el uso de factores exógenos. Peran et al. 2013¹⁰, señalan las enormes ventajas de los biomateriales nanoestructurados como herramientas terapéuticas, debido entre otras cuestiones a la gran relación superficie / volumen. Por su parte los aportes de Alpaslan & Webster 2014¹¹ mencionan la importancia de la creación de un ambiente biomimético en la regeneración tisular. Otro de los objetivos de este estudio fue la caracterización de la morfología y conservación a escala nanométrica de las estructuras que forman parte de la matriz del hueso. Para ello se realizaron magnificaciones a esta escala y para el caso del HHL el estudio se realizó en dos etapas de su procesado: antes y después de su exposición a la irradiación ionizante. Este aspecto fue tenido en cuenta ya que la esterilización de tejidos biológicos para aplicaciones clínicas por medio de la radiación gamma produce dos efectos principales en estos tejidos, uno es la muerte de los microorganismos que conduce precisamente a la esterilización del tejido¹² y el otro indeseable a dosis altas de radiación, que es el cambio inducido en la estructura química de estos tejidos y su consecuente cambio en las propiedades físicas¹³. Houben 1971¹⁴ demostró que este tipo de

radiación sobre el hueso produce la ionización y excitación del tejido, lo que conduce a rupturas de enlaces en las moléculas por efecto directo de la radiación, y por efectos indirectos la producción de radicales libres debido a la radiólisis del agua lo que puede provocar cambios estructurales. Como ya se mencionó el principal componente de los tejidos es el colágeno, cuando se irradia este polímero en estado seco hay ruptura de cadenas polipeptídicas, mientras que si se irradia en medio húmedo se produce entrecruzamiento intra e intermolecular y el efecto degradante es mayor conforme se aumenta la dosis de irradiación¹⁵.

El hueso control (Bio-Oss®), que no fue expuesto a radiación durante su procesamiento, exhibió una organización de mineral a escala nanométrica de andamios (scaffold) similar a las fibras de colágeno con presencia de nanoporos. Nuestras observaciones del HHL nos permitieron confirmar a escala nanométrica la presencia de una red nanofibrilar con sus dimensiones características de nanoestructura, que en este caso van de los 50 a 500 nm, tanto en el caso del hueso no expuesto a la radiación ionizante como el que recibió este tratamiento durante su procesado. Esto sugiere que el proceso de fabricación no alteró las propiedades fisicoquímicas. El HHL conservó la estructura de andamiaje similar a las fibras de colágeno óseo que presenta la morfología del hueso original, como el tamaño del cristal, en las dos etapas estudiadas. Este hallazgo demuestra que los cristales minerales que se forman dentro de las fibrillas de colágeno pueden alcanzar una unión inter-cristalina suficiente para retener la estructura fibrilar incluso después de la disolución del molde de proteína.

Conclusión

Los resultados presentados pueden ser una herramienta de orientación a los profesionales del área de la cirugía maxilofacial y rehabilitación oral, en cuanto a la toma de decisiones clínicas en terapias de regeneración ósea maxilo-mandibular. Los hallazgos estructurales del hueso HHL, similares a los observados en los espacios del sistema de vasos sanguíneos Haversiano del hueso humano normal, garantizan la conservación topográfica responsable del incremento del área

superficial y consecuentemente de una gran relación superficie-volumen que favorece la reparación y regeneración ósea constituyendo características favorables para ser utilizadas como injertos. Además, el mantenimiento de la nanoestructura de la matriz extracelular le otorga mayor rugosidad, permitiendo un mayor anclaje que favorece un mejor crecimiento celular por presentación de señales topográficas esenciales, beneficiando la adhesión, proliferación y diferenciación de las células. La conservación a escala nanométrica de las estructuras permite al andamio desempeñar un papel activo en el proceso en lugar de simplemente ser un portador de células o una plantilla de tejido. El HHL debido a estas características presenta una mejor biocompatibilidad demostrando un mayor porcentaje de contacto óseo sin producir respuestas inflamatorias significativas in vivo. Es de resaltar que por primera vez se realizan caracterizaciones ultraestructurales de las matrices de fabricación local estudiadas y los hallazgos destacan la importancia de las nanomorfologías específicas en el control de la integración tisular.

Todos los autores declaran que no existen conflictos potenciales de interés con respecto a la autoría y/o publicación de este artículo.

All authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Agradecimientos

Agradecemos la lectura y crítica de este artículo de la Dra. Mabel Brunotto

Referencias

1. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Periodoncio de Inserción: Cemento, Ligamento Periodontal y Hueso Alveolar. En: Histología y Embriología Bucodental. Ed Médica Panamericana. Madrid, 2002: 2ª ed., pp 368-83.
2. Hof M, Tepper G, Semo B, Arnhart C, Watzek G, Pommer B. Patients' perspectives on dental implant and bone graft surgery: questionnaire-based interview survey. Clin. Oral Impl. Res., 2012, 1-4.
3. Misch Carl E. Rationale for Dental Implants-Anatomical Consequences of Edentulism. En: Dental Implant Prosthetics. Elsevier Health Sciences, 2014: 2ª ed., pp 10-23. Traini et al, 2015

4. Brekke J, Toth J. Principles of Tissue Engineering Applied to Programmable Osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl Biomater)*, 1998, 43:380-98.
5. Weibrich G, Götz H, Gnoth S-H, Trettin R, Duschner H, Wagner W. Charakterisierung der Oberflächenmorphologie von Knochenersatzmaterialien mittels REM. *Z Zahnärztl Implantol*: 2000; 16: 151-159.
6. ThaKral GK, ThaKral Rashmi, Sharma N, Jyotsana S, Vashish P. Nanosurface – The Future of Implants. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014 May, Vol-8(5): 7-10]
7. Rani, V.V.; Vinoth-Kumar, L.; Anitha, V.C.; Manzoor, K.; Deepthy, M.; Shantikumar, V.N. Osteointegration of titanium implant is sensitive to specific nanostructure morphology. *Acta Biomater*. 2012, 8, 1976–1989.
8. Wang, X.; Gittens, R.A.; Song, R.; Tannenbaum, R.; Olivares-Navarrete, R.; Schwartz, Z.; Chen, H.; Boyan, B.D. Effects of structural properties of electrospun TiO₂ nanofiber meshes on their osteogenic potential. *Acta Biomater*. 2012, 8, 878–885.
9. Perán M, García M A, Lopez-Ruiz E, Jiménez G and Marchal JA. How Can Nanotechnology Help to Repair the Body? *Advances in Cardiac, Skin, Bone, Cartilage and Nerve Tissue Regeneration. Materials* 2013, 6(4), 1333-1359.
10. Alpaslan E, Webster T J. Nanotechnology and picotechnology to increase tissue growth: a summary of in vivo studies. Short report. *International Journal of Nanomedicine* 2014;9 (Suppl 1) 7–12.
11. Kearney J.N. Sterilization on human tissue implants, *British Association of Tissue Bank* 1996 Newsletter 6, 2-5.
12. Bailey A.J. Effect of ionizing radiation on connective tissue components. En: *International Review of Connective Tissue Research*, D.A. 1968. Hall, ed. Academic Press. New York vol 4.
13. Houben J.C. Free radiacal produced by ionizing radiation in bone and its constituents. *International Journal Radiation Biology*. 1971, 20: 373-389.
14. Dziejzig-Goclawska A. Aplicación de la radiación ionizante para esterilizar aloinjertos de tejido conectivo. En: *radiación y operación de Banco de Tejidos*, ed. Printing Services AC. Peru, 2002.

Corresponding to /correspondencia a:

Dra. Catalina Francia

Universidad Naional de Córdoba, Facultad de Odontología

Haya de La Torre s/n Ciudad Universitaria CP5000

Te: +543515146432

Email/Correo electrónico:catalina.francia@unc.edu.ar