

**USO DE UN BIOMATERIAL A BASE DE QUITOSANO E  
HIDROXIAPATITA PARA REGENERACIÓN ÓSEA EN MODELO  
ANIMAL.**

Autor: Karla Granadillo

Tutor: Mariana Villarroel Dorrego

Trabajo Especial de Grado para la Especialización Cirugía Bucal.

Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela.

# USO DE UN BIOMATERIAL A BASE DE QUITOSANO E HIDROXIAPATITA PARA REGENERACIÓN ÓSEA EN MODELO ANIMAL.

## Resumen

El quitosano es un polímero natural, que gracias a su favorable estructura físico-química y a sus propiedades biológicas, se comporta como un compuesto biocompatible, no tóxico, antimicrobiano y biodegradable. Además, permite su combinación con otros materiales, como la hidroxiapatita, mejorando sus propiedades mecánicas. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de un biomaterial en forma de membrana, basado en quitosano e hidroxiapatita, en el proceso de regeneración ósea en un modelo animal.

**Metodología:** Fue realizada una investigación experimental usando 27 ratas de la cepa *Wistar*, a las cuales se les realizó un defecto óseo en cada tibia. Fue confeccionada, e implantada una membrana a base de quitosano e hidroxiapatita en el defecto de la tibia derecha (tibia experimental), mientras que el defecto de la tibia izquierda (tibia control) permaneció vacío. Las ratas fueron sacrificadas al mes y otras a los 3 meses postquirúrgicos. Se realizó evaluación imagenológica, histológica y ultraestructural de las tibias extraídas. Las variables fueron comparadas mediante los test de *t* student y  $\chi^2$ . Valores  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

**Resultados:** Radiográficamente, tanto para 1 mes como 3 meses postoperatorios, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las densidades óseas de las tibias control y experimental. Histológicamente, se observó la presencia del material, pasado 1 mes y 3 meses, en el 80% y 86,6 % de los casos, respectivamente. A 1 mes postoperatorio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la neoformación ósea de las tibias control y experimental, sin embargo, a los 3 meses las tibias experimentales mostraron una mayor formación de tejido óseo ( $p = 0,011$ ). La evaluación ultraestructural demostró una importante bioactividad del biomaterial con el tejido óseo circundante.

**Conclusión:** El biomaterial desarrollado fue de sencilla elaboración, viable, accesible económicamente, de fácil manipulación y tolerable para los animales. Su biodegradabilidad fue lenta y se demostró que interactúa positivamente con el tejido óseo, acelerando el proceso de neoformación ósea a los 3 meses postoperatorios.

## INTRODUCCIÓN

La regeneración tisular es un proceso por el cual el tejido originado es estructural y funcionalmente idéntico al tejido inicial<sup>1</sup>. El hueso es un tejido capaz de regenerarse a sí mismo de manera completa, a través de la reactivación de los procesos que tienen lugar durante su embriogénesis<sup>1</sup>. Cuando el tejido óseo sufre una fractura, se pone en marcha un proceso que conduce a la reposición de la estructura y funciones perdidas. La reparación de fracturas no es más que un proceso de cicatrización cualquiera, en la que el tejido repuesto posee una pobre organización. La reparación ósea es un auténtico proceso regenerativo<sup>2</sup>.

La regeneración ósea tiene varias fases. Tras un daño inicial, se produce una laceración de los vasos sanguíneos que conlleva al exudado de líquidos y proteínas plasmáticas, seguida de la formación de un coágulo de fibrina, gracias a la cascada de coagulación. En la fase inicial del coágulo aparecen factores de crecimiento que actúan quimiotácticamente sobre las células mesenquimales indiferenciadas y sobre los osteoblastos que se van acercando a la lesión, en pequeñas cantidades<sup>3,4</sup>. Durante esta fase, aparecen también las interleuquinas y las proteínas óseas morfogenéticas procedentes de la matriz extracelular del hueso adyacente y de los osteoblastos. En este coágulo inicial, los productos de degradación producidos por la necrosis celular y los factores de crecimiento, atraen a los neutrófilos, linfocitos y macrófagos que inician entonces el proceso de fagocitosis<sup>5</sup>.

Entre el tercer y quinto día posterior al trauma inicial, va desapareciendo la red de fibrina, dando paso a la formación de un tejido de granulación, que se mantiene aproximadamente por 14 días. Se regeneran nuevos vasos y colágeno que forman una nueva red; aparecen nuevas células tipo fibroblastos, aumentando la proporción de la fase celular del callo óseo. Los macrófagos pasan a ser los principales productores de citoquinas, se expresan nuevos factores de crecimiento que promoverán la angiogénesis<sup>6</sup>. Posteriormente se da una fase de proliferación y diferenciación celular, donde las células mesenquimales indiferenciadas son capaces de acceder al foco de la lesión desde los tejidos circundantes (periostio y medula ósea) y la sangre. El primer tipo de tejido óseo que se forma es el osteoide o matriz extracelular no mineralizada, la cual formará el andamio fundamental para la mineralización de la matriz.

El osteoide es mineralizado progresivamente por un gran número de cristales de hidroxiapatita, formando el hueso inmaduro entrelazado o callo blando, entre la segunda y sexta semana, en donde se deposita en 70% del mineral del hueso inmaduro. Su organización y el depósito del 30% restante pueden durar varios meses. Esta mineralización está influenciada por proteínas tipo fosfatasa alcalina, osteopontina, fibronectina, sialoproteína ósea entre otras. Una vez formado el hueso entrelazado, aumenta la mineralización y compactación laminar alrededor de los vasos sanguíneos, esta organización forma las denominadas osteonas o trabéculas primarias, que siguen estando formadas por hueso inmaduro y que posteriormente pasan por un proceso de remodelado para convertirse en osteonas secundarias, formadas por hueso laminar<sup>5</sup>.

Hoy día, muchos sustitutos óseos y biomateriales son utilizados ampliamente en la práctica clínica como complementos o alternativas al hueso autólogo, ya que promueven la migración, proliferación y diferenciación celular para la regeneración ósea, especialmente para la regeneración de defectos óseos grandes, donde el requisito de un material que sirva como injerto es sustancial<sup>7</sup>. Conceptualmente un biomaterial no es más que una sustancia o una combinación de sustancias que puede ser usada por un período de tiempo como un todo o formando parte de un sistema que aumenta o sustituye un tejido, órgano o función del cuerpo. Es decir, un material no vivo, usado como dispositivo biomédico dirigido a interactuar con el sistema biológico<sup>8</sup>. En sentido práctico, los principales biomateriales son los injertos óseos, los metales, los polímeros, las cerámicas, todos éstos son fabricados o procesados para adaptarlos a su adecuado uso como un dispositivo médico que entrará en íntimo contacto con las proteínas y células de los órganos y tejidos del cuerpo. Los biomateriales pueden también ser compuestos de 2 o más de ellos, con la intención de mejorar sus propiedades y lograr mejor aplicabilidad, en especial en el campo de la cirugía ortopédica y los implantes dentales<sup>9</sup>.

La hidroxiapatita (HA) es el principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados; también la encontramos en la dentina y el esmalte dental. Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética, presenta características de

biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad, las cuales hacen al material muy útil para usos biomédicos<sup>10</sup>. Los implantes de cerámica para regeneración están básicamente hechos de HA, estos andamios tienen alta porosidad y tienen una importante propiedad osteoconductor<sup>11</sup>. Dentro de las desventajas asociadas a su uso, se encuentra la alta tasa de fragilidad y su lenta degradación<sup>12</sup>.

En los últimos tiempos, se ha presentado especial atención al quitosano, un derivado de la quitina, de alto peso molecular que constituye uno de los biopolímeros naturales más abundantes en la naturaleza. En el caso del quitosano y sus derivados, el desarrollo de sus nuevas aplicaciones, se debe principalmente al hecho de ser una fuente de energía renovable de los recursos naturales y de fácil disponibilidad<sup>13</sup>. El quitosano es un polisacárido lineal que se obtiene por desacetilación extensiva de la quitina. La quitina es un polímero natural abundante, distribuido en la naturaleza, tanto en el reino animal como en el vegetal. El quitosano está compuesto por amino azúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  formando una cadena lineal de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa. Las principales fuentes de obtención son los caparazones de cangrejo, camarón, langostino y langosta<sup>14</sup>.

Es un polímero biocompatible y biodegradable, que promueve la adhesión celular y es reabsorbido por medio de la hidrólisis por enzimas presentes en los fluidos<sup>15</sup>. Las propiedades antes mencionadas, junto con sus demostradas propiedades curativas, hemostáticas, su variedad de presentación (microesferas, membranas bidimensionales, andamios tridimensionales), su flexibilidad, adhesividad, así como su facilidad para promover la formación ósea<sup>16</sup>, hacen del quitosano un excelente candidato de los polímeros con aplicaciones biomédicas, en especial en el campo de la regeneración ósea<sup>15</sup>. Sin embargo, el quitosano muestra pobres propiedades mecánicas, lo que explica el creciente interés en la combinación de materiales inorgánicos para la obtención de nuevos compuestos con una mejora de las características mecánicas, también necesarias y favorables para la ingeniería de tejidos<sup>17, 18</sup>. Es así como se pretendió en el presente trabajo, utilizar combinaciones de dos biomateriales para la regeneración ósea como lo son el

quitosano y la HA. El objetivo de la investigación fue determinar el efecto de un biomaterial confeccionado en forma de membrana, basado en quitosano e HA, en el proceso de regeneración ósea en un modelo animal.

## **METODOLOGÍA**

Fue realizado un estudio experimental en modelo animal usando una población de 27 ratas de la cepa *Wistar* de 4-5 meses de edad adulta, de 500 gr. de peso, del género masculino. La creación y cuidado de estos animales se realizó en el Bioterio de la Universidad de Los Andes.

### ***Confección de la membrana de quitosano e hidroxiapatita***

El biomaterial utilizado fue confeccionado en el Laboratorio Integrado de Biología Molecular y Celular de la Universidad de Los Andes. Para la preparación del dispositivo de quitosano, se utilizó 5 gr. quitosano certificado (Quitosan® Guinama, S.L.U) en una solución ácida constituida por ácido acético al 99%, dejándose en agitación constante por más de 12 horas y obteniendo un gel de quitosano ácido (Fig. 1). El volumen total de la solución de quitosano ácido fue doblemente filtrado, para eliminar las impurezas y microorganismos que pudieran contaminar la solución. Una vez filtrado, la solución de quitosano se mezcló con 0,2 gr. de HA nanométrica y se dispensó un volumen en placas de Petri (Fig. 2), las cuales se llevaron a una estufa de calor seco a 40°C durante 16 horas hasta evaporar completamente la fase líquida obteniendo la deshidratación del compuesto en una fina película (Fig. 3).

Las películas de quitosano más HA fueron neutralizadas con NaOH al 0.5% hasta su desprendimiento de la placa de Petri y posteriormente fueron lavadas abundantemente con agua destilada a fin de eliminar los restos del NaOH al 0.5%. La película neutralizada se colocó en un envase para darle la forma deseada y se incubó por 2 horas a 50° C para su secado. Posteriormente se recortaron y esterilizaron en una cámara de luz ultravioleta por

15 minutos para luego ser selladas en empaques de fabricación propia lista para su uso (Fig. 4).

### ***Evaluación ultraestructural del biomaterial***

La evaluación ultraestructural del biomaterial a base de Quitosano e HA fue realizada en el Laboratorio de Análisis Químico y Estructural de Materiales (LAQUEM), de la Universidad de Los Andes. Para esto, una muestra del biomaterial fue cubierta con una capa de oro metalizado, por aproximadamente 15 minutos, para lograr la conductividad de la superficie, eliminar la electricidad estática, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica, para luego ser montadas y observadas para su análisis en un microscopio electrónico de barrido HITACHI® modelo S-2500 (Fig. 5).

### ***Creación del defecto óseo y colocación de la membrana***

Las muestras para estudio correspondieron a ambas tibias de cada animal, a las cuales se les realizó un defecto óseo quirúrgico. Posteriormente, se colocó el biomaterial a base de quitosano e hidroxiapatita en el defecto de la tibia derecha, siendo ésta la tibia experimental, mientras que el defecto de la tibia izquierda permaneció vacío, utilizándose como tibia control.

El grupo total de animales, fue dividido en dos grupos organizados según el tiempo de eutanasia. Un grupo A, de 11 ratas, a las que se les realizó la eutanasia a los 30 días postquirúrgicos, para coincidir con el comienzo de la fase de mineralización del remodelado óseo, donde se observa el depósito de material osteoide<sup>18</sup>. El segundo grupo, Grupo B, tuvo un total de 16 ratas, a las que se les realizó eutanasia a los 90 días postquirúrgicos, tiempo en el que se reporta la culminación de la fase de mineralización en el hueso trabecular<sup>18</sup>.

Para la realización del defecto óseo se realizó sedación vía intraperitoneal de los animales, administrándose ketamina 75 mg/kg. de peso más xilacina 10 mg/kg. de peso y anestesia

local de la zona a intervenir mediante infiltración de 0,25 ml de lidocaína (Rapicaine ®) al 2%, con adrenalina 1:100.000. Para el abordaje quirúrgico, se realizó un rasurado de la piel de la zona anterior de las extremidades posteriores, con una hoja de bisturí N° 15, asepsia de la zona con iodopovidona (Betadine®) al 10%, abordaje de cada una de las tibias con una incisión cutánea de 15 mm. de extensión, con una hoja de bisturí N° 15, longitudinal al eje de cada tibia del animal. Se procedió a la separación de los planos musculares y periósticos y una vez expuestas las tibias, se procedió a realizar un defecto óseo en cada una, rectangular, de aproximadamente 5 mm. de largo por 1 mm. de ancho y 2 mm. de profundidad, utilizando una fresa de diamante cilíndrica estéril a baja velocidad, en posición totalmente vertical y en refrigeración constante con solución fisiológica.

En el defecto óseo de la tibia experimental se procedió a colocar el biomaterial de quitosano con hidroxapatita. Se limpiaron y suturaron las heridas con puntos simples utilizando catgut crómico 4-0. Se administró medicación analgésica postoperatoria con meloxicam (Mobic®) de 15mg/1,5 ml., dosis de 0,1 ml. vía subcutánea, 1 vez al día por 3 días y antibioticoterapia con sulbactam sódico 0,5 gr. / ampicilina sódica 1 gr. (Unasyn® 1,5 gr.), diluidos en 10 ml. de solución fisiológica, dosis única de 0,1 ml. vía intramuscular (Fig. 6-15). Se realizó un seguimiento clínico postquirúrgico (Fig.16).

#### ***Eutanasia y obtención de las muestras para estudio***

La eutanasia de los animales se realizó colocando a los mismos en una campana de enflurano completamente sellada, con una sobreexposición de 2 a 4 minutos (Fig. 17). Se realizó la exposición completa de las tibias del animal, mediante cortes de la piel y músculo con hoja de bisturí N° 15 y tijeras. Se almacenaron las muestras individualmente en frascos recolectores con formol al 10% (Fig. 18).



### ***Evaluación imagenológica***

Las pruebas radiográficas fueron realizadas en el Servicio de Cirugía Bucal y Maxilofacial del Hospital Ortopédico Infantil. Se realizó la evaluación imagenológica a los dos grupos A y B, mediante la toma de radiografía con un equipo radiográfico de pared (Gnatus®), graduado en intensidad 70 kVp, 7 mA, con tiempo de exposición de 0,4 segundos, obteniendo así una imagen radiográfica digital, mediante un captador RVG 5100 y el software 6.10.8.7 de Kodak Dental.

La tibia experimental y la tibia control de un mismo animal, se colocaron sobre el captador de imagen radiográfica. Una vez obtenida la imagen digital, se le aplicó el programa *densitométrico*, el cual permite recorrer la imagen con el cursor registrando una valoración numérica de la densidad promedio de la zona señalada por el cursor. Se obtuvieron 2 valoraciones numéricas por cada tibia, la primera correspondiente a la densidad ósea normal (DON) para lo cual se promediaron medidas tomadas en diferentes puntos, superior e inferior al defecto. La segunda medida correspondió a la densidad ósea del defecto (DOD), para lo cual se promediaron medidas en diferentes puntos dentro de los límites del defecto óseo creado (Fig. 19). Estas medidas fueron tomadas en ambas tibias para su comparación estadística. Los datos fueron recolectados en medias  $\pm$  desviación típica.

### ***Procesamiento y análisis histopatológico***

Todas las tibias fueron descalcificadas individualmente durante 1 semana en ácido clorhídrico más formaldehído (Osteomoll®). Posteriormente las muestras fueron colocadas en casetes e introducidas en una máquina procesadora de tejidos (Start Tissue – Tek II), en la cual se cumplieron las siguientes fases:

1. Deshidratación con alcoholes de gradación creciente.
2. Aclaramiento con xilol, que desplaza el alcohol para permitir la miscibilidad con la parafina fundida.
3. Embebimiento e inclusión en parafina líquida.
4. Cortes de 5 micrómetros con un microtomo y montaje en láminas portaobjeto.
6. Tinción con Hematoxilina y Eosina.

Las láminas fueron observadas por medio de microscopio óptico para determinar la presencia del material y la neoformación ósea, en escalas nominales y ordinales de cada variable respectivamente.

### ***Evaluación ultraestructural de las muestras***

Para este análisis se utilizaron las tibias de una rata del Grupo A y una rata del Grupo B. Las cuatro tibias fueron embebidas en etanol durante una semana para eliminar los restos del formol provenientes del almacenamiento de las mismas. Posteriormente se procesaron como se describió anteriormente obteniendo así una descripción cualitativa de las muestras.

### ***Análisis estadístico de los datos***

Las variables fueron analizadas descriptivamente mediante medias y desviación estándar y porcentajes dependiendo de la naturaleza del dato. Las variables numéricas fueron comparadas mediante la prueba de *t* de student y las medias comparadas. Las variables categóricas nominales fueron comparadas usando  $\chi^2$ . El nivel de confiabilidad fue establecido 5% ( $\alpha=0.05$ ) y todo valor  $p<0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## **RESULTADOS**

### ***Análisis densitométrico de las tibias***

En el grupo de 1 mes, las tibias controles obtuvieron un valor medio de DON de  $13,48\pm 11,12$ . En el caso de las tibias experimentales la media fue de  $12,39\pm 7,53$  (Tabla 1) (Fig. 20). Aunque la media de las tibias controles es discretamente mayor, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,794$ ). En el grupo de 3 meses, las tibias controles obtuvieron valores de densidad media de  $11,95\pm 4,47$ . En el caso de las tibias experimentales la media fue de  $8,68\pm 5,42$  (Tabla 2) (Fig. 21). Similar a los resultados al mes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ( $p= 0,115$ ).

### ***Cambios histológicos tisulares en los defectos de las tibias***

En relación a la presencia del material, el 80% de las tibias experimentales, aun mostraban la presencia histológica del biomaterial pasado 1 mes postoperatorio (Fig. 22). A los 3 meses postoperatorios, en el 86.6% de las tibias pudo observarse parte del biomaterial (Fig. 23). Con respecto a la neoformación ósea al mes del postoperatorio, la misma fue mayor en el grupo de tibias experimentales, sin embargo los resultados no fueron estadísticamente significativos ( $p= 0,329$ ) (Tabla 3) (Figs. 24 y 25). Sin embargo, a los 3 meses postoperatorios, se logró observar una neoformación ósea mayor estadísticamente significativa en el grupo de tibias experimentales ( $p= 0,011$ ) (Tabla 4) (Fig. 26).

### ***Cambios ultraestructurales***

La microfotografía al mes de la tibia control, presenta la reparación de parte del defecto óseo (Fig. 27). En la tibia experimental pudo apreciarse la presencia del material implantado y el tejido organizado a su alrededor para la neoformación ósea (Fig. 28). Así mismo pudieron detectarse las células óseas migrando hacia el material (Fig. 29). En la muestra control a los 90 días, se observa el tejido óseo el cual se proyecta mínimamente hacia el defecto vacío y la presente formación de fibras colágenas que aparecen de forma desorganizada en el centro del defecto (Fig. 30). En la tibia experimental se observa el defecto casi cubierto en totalidad (Figs. 31 y 32).

## **DISCUSIÓN**

Diferentes biomateriales absorbibles hechos de varios tipos de polímeros, incluyendo quitosano, han sido desarrollados hoy en día y muchos estudios se han llevado a cabo demostrando sus efectos curativos<sup>19</sup>. En el presente estudio la implantación de quitosano demostró inducir la regeneración ósea efectivamente. Otros estudios han demostrado la promoción de la síntesis de colágeno y la diferenciación de células osteogénicas a través del uso del quitosano<sup>20-21</sup>.

El quitosano no solamente parece tener un gran potencial para acelerar la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico, sino también se ha demostrado su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis* y *Candida krusei*<sup>22</sup>. Otro de los efectos antimicrobianos del quitosano fue evaluado en un estudio, donde se comprobó el efecto de un enjuague bucal a base de quitosano para la reducción de la formación de placa dental<sup>23</sup>.

Otras propiedades del quitosano son las relacionadas con la inflamación, donde se ha mostrado absorción de bradiquinina y protones comprobando así el efecto analgésico de estos polímeros<sup>24</sup>. A pesar de todas las bondades que ofrece el quitosano, carece de las propiedades mecánicas suficientes que demanda un material de regeneración ósea en odontología. En este trabajo, esa propiedad fue reforzada mediante la adición de HA, de manera efectiva. El refuerzo inorgánico de este tipo de compuestos, proporciona resistencia y rigidez, y mediante la incorporación de quitosano, las propiedades biológicas pueden ser mejoradas, resultando en una matriz polimérica que funciona como relleno, con una suma de propiedades que resulta muy ventajosa<sup>14</sup>.

Estudios han demostrado que los biomateriales compuestos de quitosano e hidroxiapatita, pueden servir como andamio tridimensional, participando en la fijación celular *in vitro* y la migración ósea en los tejidos periodontales<sup>25</sup>. El quitosano brinda la propiedad bioactiva, la cual promueve la adhesión de los componentes tipo factores de crecimiento y BMPs, por lo que puede ser ampliamente utilizado en el campo de la regeneración ósea<sup>26</sup>. Por otro lado, la hidroxiapatita nanoparticulada tiene propiedades especiales, gracias a su pequeño tamaño y a su gran área de superficie específica y se ha demostrado un aumento significativo en la adsorción de proteínas y la adhesión de osteoblastos en esta cerámica de tamaño nanométrico<sup>27</sup>.

Shin *et al.*<sup>19</sup> evaluaron el efecto de membranas de quitosano a diferentes concentraciones de HA para la regeneración ósea de defectos craneales de ratas, demostrando que todos los grupos experimentales, independientemente de la concentración del material, presentaban una mayor formación ósea local entre la segunda y octava semana, en comparación con un grupo control. A medida que la dosis de HA aumentó, hubo mayor neoformación ósea en el período de curación temprana, mientras que no hubo diferencia significativa con el paso del tiempo. Contrario a los resultados de nuestro estudio, la primera evaluación postoperatoria que se realizó a las 4 semanas, a pesar de que la neoformación ósea fue mayor en el grupo al que se le aplicó el biomaterial, no mostró diferencias estadísticamente significativas. Esto puede deberse a la baja concentración de HA en las membranas implantadas, concentración que pareciera ser inversamente proporcional a la neoformación ósea en etapas tempranas.

Idealmente, el sustituto óseo debe inducir la formación ósea al mismo tiempo que sea completamente reabsorbido y sustituido por el tejido óseo. La evidencia de estudios previos sugiere que la reabsorción de HA puede estar mediada por células o por desintegración a través de la acción de fluidos extracelulares<sup>28,29</sup>. Liljensten *et al.*<sup>30</sup> aseveran que incluso cuando la HA se considera reabsorbible, el proceso es lento y su finalización no está bien determinada. Takeshita *et al.*<sup>31</sup> estudiaron la relación de los gránulos densos de HA en defectos óseos creados alrededor implantes oseointegrados, llegando a la conclusión de que estos gránulos interfieren negativamente con la neoformación ósea.

En concordancia con Liljensten *et al.*<sup>30</sup> el material en las tibias se conservó hasta 3 meses después de su colocación, sugiriendo una reabsorción lenta del mismo, sin embargo, contrario a Takeshita *et al.*<sup>31</sup> la HA utilizada en nuestro estudio fue de nanoparticulada y en los casos donde se observaba presencia del material, era en donde la neoformación ósea era más evidente.

Peral *et al.*<sup>32</sup> realizaron un estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de ratas con diferentes biomateriales, donde se realizó valoración histológica y radiológica del tejido neoformado. En correspondencia con nuestro estudio no hubo semejanza entre los resultados radiográficos y los resultados histológicos, sugiriendo que la valoración radiográfica por sí sola, no debe ser utilizada como único criterio para evaluar la regeneración ósea, debiendo correlacionarse con los hallazgos histológicos para asegurar la evaluación objetiva del proceso.

## **CONCLUSIONES**

El biomaterial desarrollado a base de quitosano e HA fue de sencilla elaboración, viable, accesible económicamente, de fácil manipulación y tolerable para los animales en estudio. Su biodegradabilidad fue lenta y se demostró que interactúa positivamente con el tejido óseo, acelerando el proceso de neoformación ósea a los 3 meses postoperatorios. El uso de biomateriales a base de quitosano e HA constituyeron excelentes andamios para la regeneración ósea de alta bioactividad y lenta biodegradabilidad en el modelo animal estudiado.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Swennen G, Dempf R, Schliephake H. Cranio-facial distraction osteogenesis: a review of the literature. Part II: Experimental studies. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31(2):123-135.
2. Becerra J, Andrades J, Santamaría J, Cifuentes M, Guerado E. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin* 2001; 116:23-34.
3. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation on fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999; 14(11):1805-15.

4. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(6):638-46.
5. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11(2):E151-7.
6. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998; (355 Suppl):S82-9.
7. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 2011; 9:66.
8. Cárdenas G, Anaya P, von Plessing C, Rojas C, Sepúlveda J. Chitosan composite films. Biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(6):2397-405.
9. Nascimento Cássio do, Issa João Paulo Mardegan, Oliveira Rafael Ramos de, Iyomasa Mamie Mizusaki, Siéssere Selma, Regalo Simone Cecilio Hallak. Biomaterials Applied to the Bone Healing Process. *Int J Morphol* 2007; 25(4): 839-846.
10. Londoño M, Echavarría A, De La Calle F. Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Rev EIA* 2006; 5: 109-118.
11. Dong J, Kojima H, Uemura T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 2001; 57(2):208-16.
12. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002; (395):81-98
13. Bansal V, Sharma PK, Sharma N, Pal OP, Malviya R. Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery. *Advan Biol Res* 2011; 5 (1): 28-37.
14. Peniche C, Solís Y, Davidenko N, García R. Chitosan/hydroxyapatite-based composites. *Biotecnología Aplicada* 2010; 27:202-210.

15. VandeVord PJ, Matthew HW, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(3):585-90.
16. Kosaraju SL, D'ath L, Lawrence A. Preparation and characterization of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers* 2006; 64(2): 163-167.
17. Jin HH, Kim DH, Kim TW, Shin KK, Jung JS, Park HC, Yoon SY. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2012; 51(5):1079-1085.
18. Lin HR, Yeh YJ. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 71(1):52-65.
19. Shin JA, Choi JY, Kim ST, Kim CS, Lee YK, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. The Effects of Hydroxyapatite-Chitosan Membrane on Bone Regeneration in Rat Calvarial Defects. *J Korean Acad Periodontol* 2009; 39:213-222.
20. Pang EK, Paik JW, Kim SK, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Kim CK, Choi SH. Effects of chitosan on human periodontal ligament fibroblasts in vitro and on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2005;76(9):1526-33.
21. Jung UW, Suh JJ, Choi SH. The bone regenerative effects of chitosan on the calvarial critical size defect in Sprague- Dawley rats. *J Korean Acad Periodontol* 2000; 30:851-868.
22. Tikhonov V, Stepnova E, Babak V, Yamskov I, Palma-Guerrero J, Jansson H, López-Llorca L, Salinas J, Gerasimenko D, Avdienko I, Varlamo V. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-(2,3)-(dodec-2-enyl)succinoyl-derivatives. *Carbohydrate Polymers* 2006; 64:66–72.
23. Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T, Takaesu Y. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *Bull Tokyo Dent Coll* 2003; 44(1):9-16.
24. Okamoto Y, Kawakami K, Miyatake K, Morimoto M, Shigemasa Y, Minami S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 2002; 49:249-252.



25. Zhang YF, Cheng XR, Chen Y, Shi B, Chen XH, Xu DX, Ke J. Three-dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue. *J Biomater Appl* 2007; 21(4):333-349.
26. Jung UW, Song KY, Kim CS, Lee YK, Cho KS, Kim CK, Choi SH. Effects of a chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid on bone regeneration in a rat calvarial defect. *Biomed Mater* 2007; 2(3):S101-5.
27. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2000; 21(17):1803-1810.
28. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res* 1999; 44(1):31-43.
29. Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002; 63(2):200-208.
30. Liljensten E, Adolfsson E, Strid KG, Thomsen P. Resorbable and nonresorbable hydroxyapatite granules as bone graft substitutes in rabbit cortical defects. *Clin Implant Dent Relat Re.* 2003; 5(2):95-101.
31. Takeshita F, Ayukawa Y, Iyama S, Suetsugu T, Oishi M. Histological comparison of early wound healing following dense hydroxyapatite granule grafting and barrier placement in surgically-created bone defects neighboring implants. *J Periodontol* 1997; 68(10):924-932.
32. Peral Cagigal B, Redondo González LM, Verrier Hernández A, Serrat Soto A, Torres Nieto MÁ, Vaquero Puerta C. Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Rev Esp Cirug Oral Maxilofac* 2008; 30(5): 313-323.

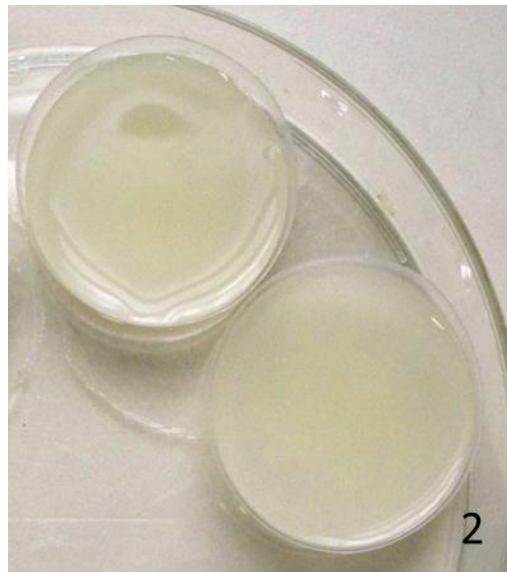
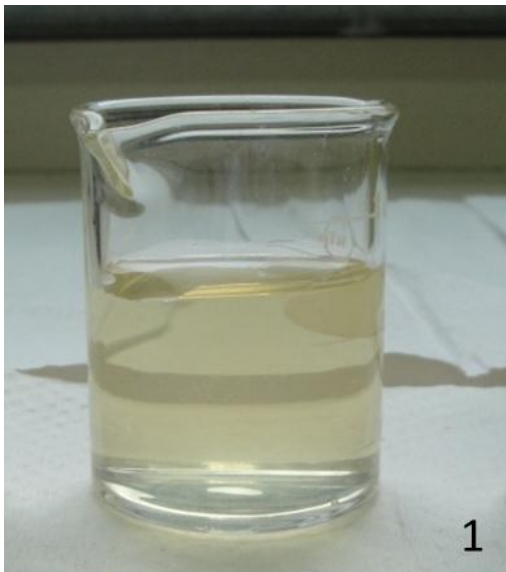


Fig. 1 Quitosano en forma de gel. Fig. 2 Mezcla de Quitosano e HA en cápsulas de Petri. Fig. 3 Deshidratación del compuesto. Fig.4 Película final de Quitosano más HA.

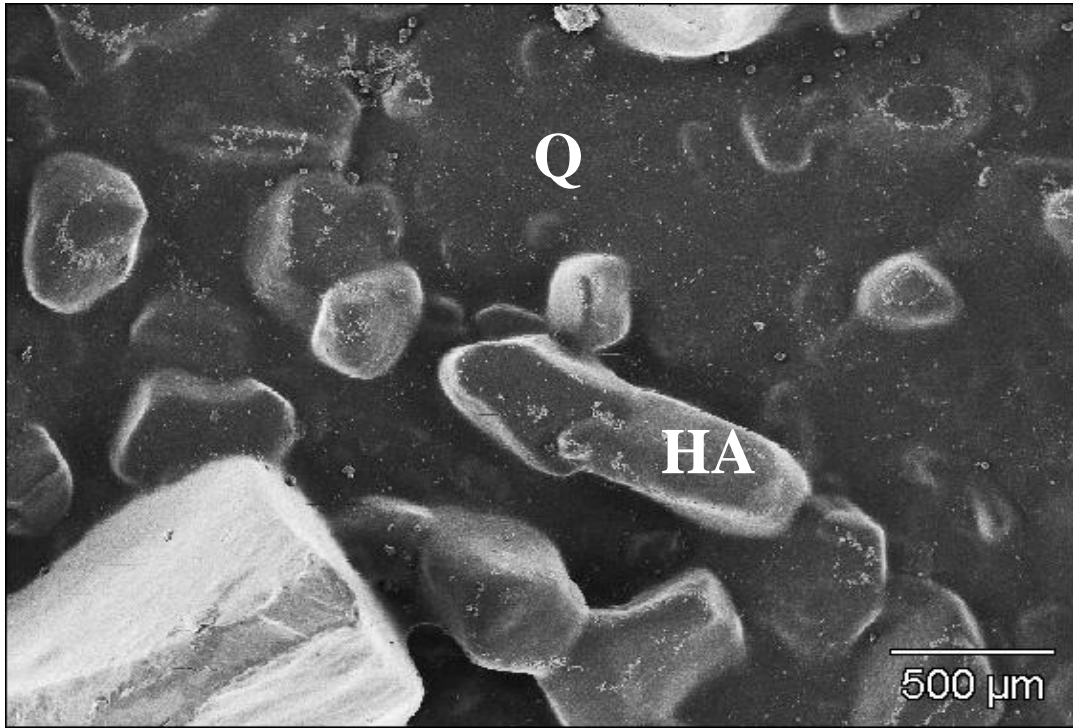


Fig.5. Microfotografía (100X) de una membrana de quitosano más HA donde se observa la matriz orgánica del quitosano (Q) y las partículas de HA perfectamente unidas a ella.



Fig.6. Sedación del animal. Fig.7. Rasurado de la zona a intervenir. Fig.8. Incisión en los tejidos blandos para exponer el hueso. Fig.9. Exposición de la tibia para su perforación. Fig.10. Creación del defecto óseo en tibia. Fig.11. Defecto óseo realizado. Fig.12. Colocación del material a base de quitosano. Fig.13. Síntesis de los tejidos. Fig.14 Medicación analgésica S.C. Fig. 15. Medicación antibiótica I.M.





Fig. 16. Colocación de los animales en sus cajas para el cuidado postquirúrgico.



Fig.17. Sobreexposición al enflurano para el sacrificio del animal bajo los estándares de bioética.



Fig.18. Exposición y extracción de las tibias del animal para obtención de muestras para estudio.

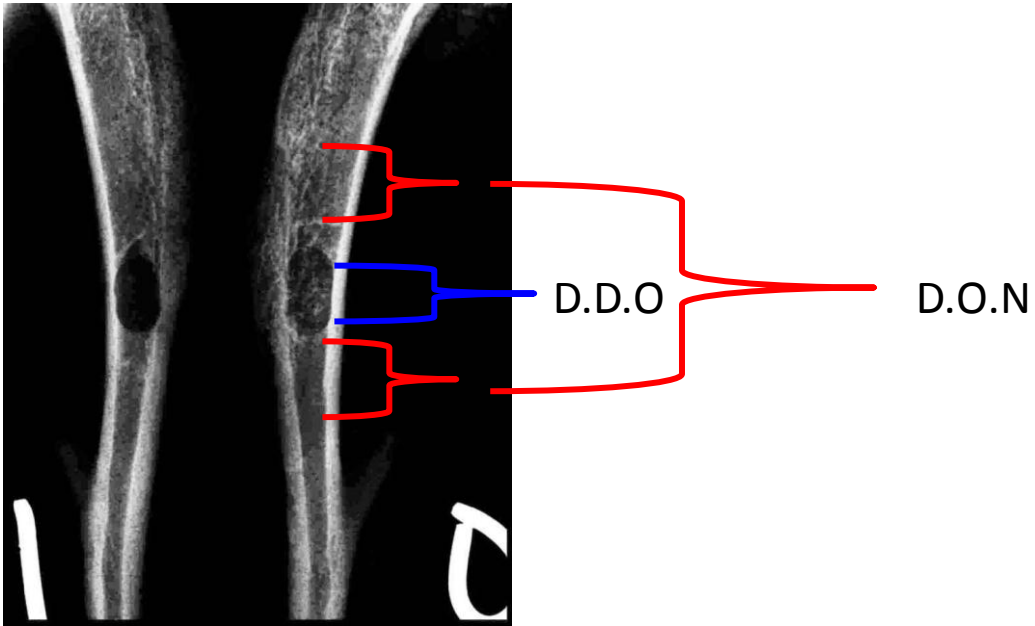


Fig.19. Medidas tomadas para la evaluación imagenológica.



Fig.20. Radiografía digital 1 mes.  
Tibias control (izquierda) y experimental (derecha).



Fig.21. Radiografía digital 3 meses.  
Tibias control (izquierda) y experimental (derecha).



Tabla 1. Distribución de la población según los valores de densidad al mes postoperatorio.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Valores de densidad de tibias controles 1 mes	10	2	42	13,48	11,123
Valores de densidad de tibias experimentales 1 mes	11	4	29	12,39	7,531

Tabla 2. Distribución de la población según los valores del análisis densitométrico de 3 meses.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Valores de densidad de tibias controles 3 meses	11	3	19	11,95	4,473
Valores de densidad de tibias experimentales 3 meses	15	0	22	8,68	5,425

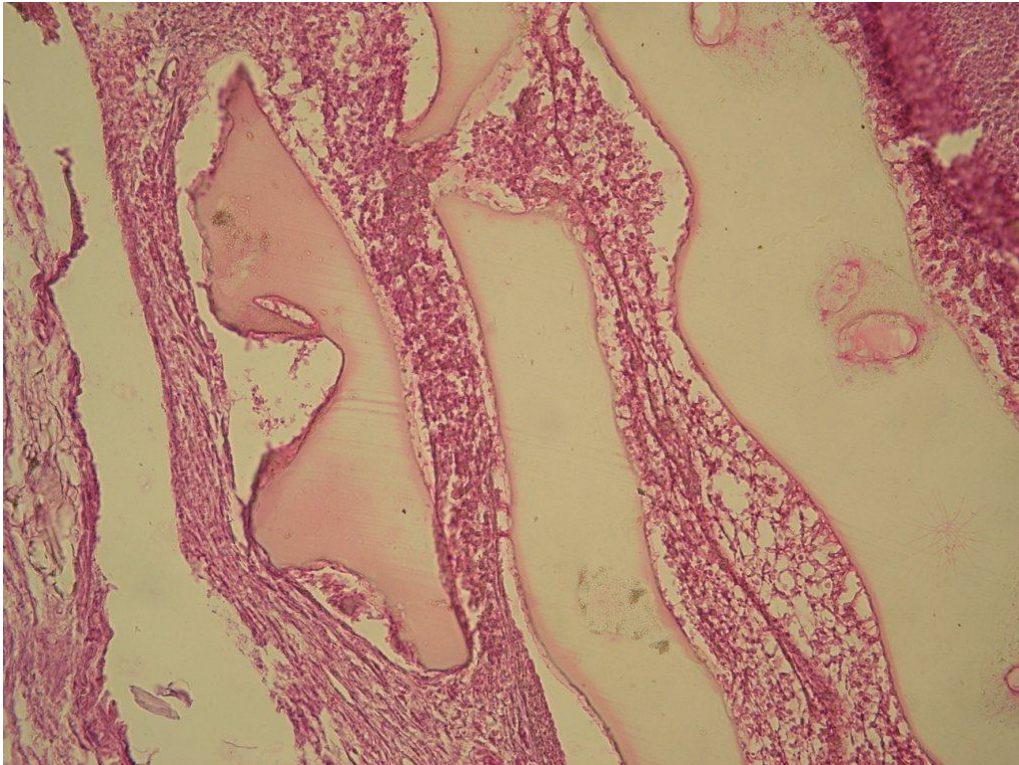


Fig. 22. Corte histológico de tibia experimental al mes de postoperatorio, en la cual se aprecia el material rodeado de un denso infiltrado celular mononuclear principalmente y abundantes vasos sanguíneos (X100).

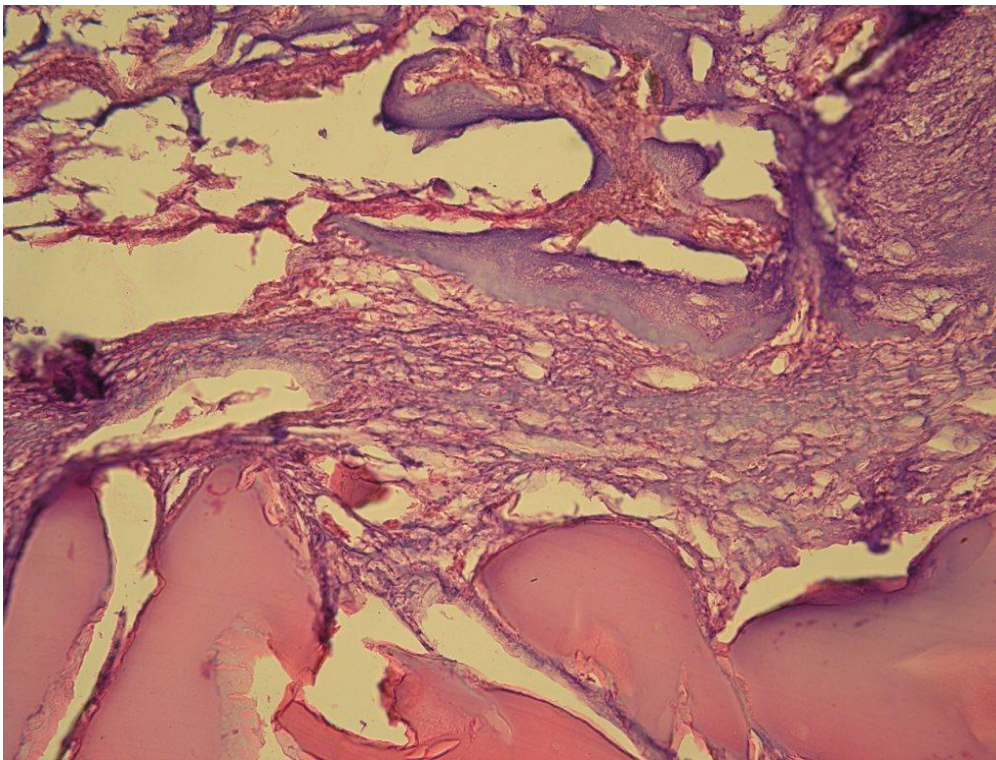


Fig. 23. Corte histológico de tibia experimental en la cual se aprecia el material rodeado de un tejido óseo inmaduro neoformado a los 3 meses postoperatorios (X100).



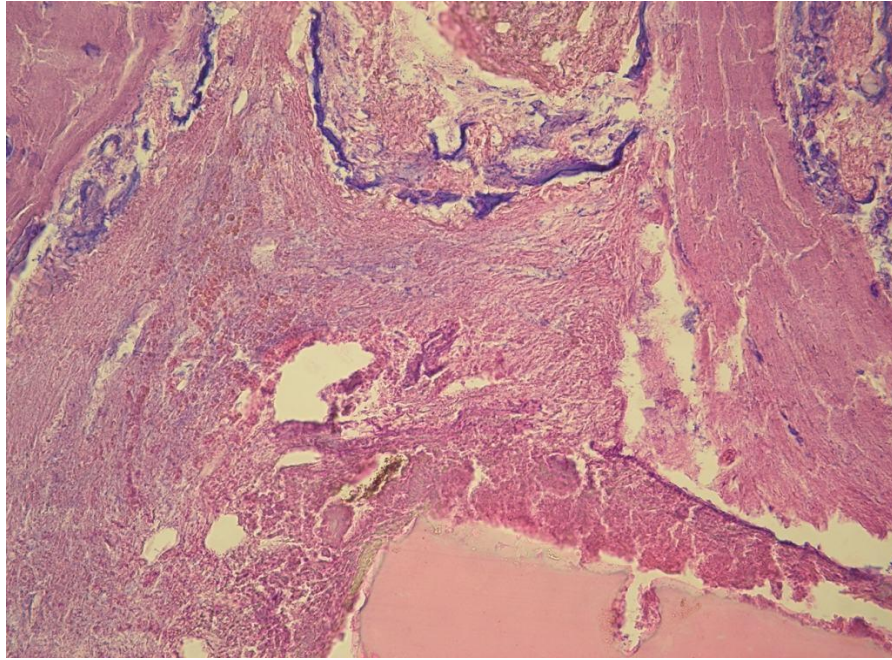


Fig. 24. Corte histológico de tibia experimental al mes de postoperatorio en la cual se aprecia escasa formación de tejido osteoide cercano al material de quitosano más HA (X40).

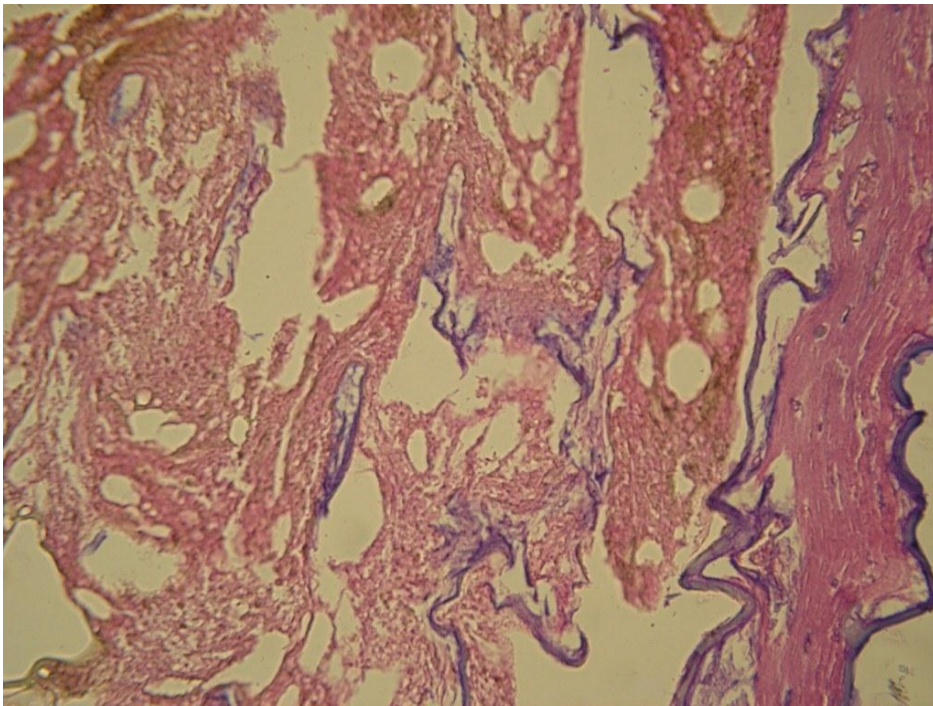


Fig. 25. Corte histológico de tibia control iniciando el proceso de regeneración ósea al mes de postoperatorio (X40).

**Tabla 3.** Neoformación ósea histológica al mes del postoperatorio.

		Neoformación ósea histológica			Total
		1 mes			
		Ausente	Escasa	Moderada	
Neoformación Ósea	Control	2	4	4	10
	Experimental	0	5	5	10
Total		2	9	9	20

**Tabla 4.** Neoformación ósea histológica a los 3 meses del postoperatorio.

		Neoformación ósea histológica 3 meses			Total
		meses			
		Escasa	Moderada	Abundante	
Neoformación ósea	Control	9	2	4	15
	Experimental	3	10	2	15
Total		12	12	6	30



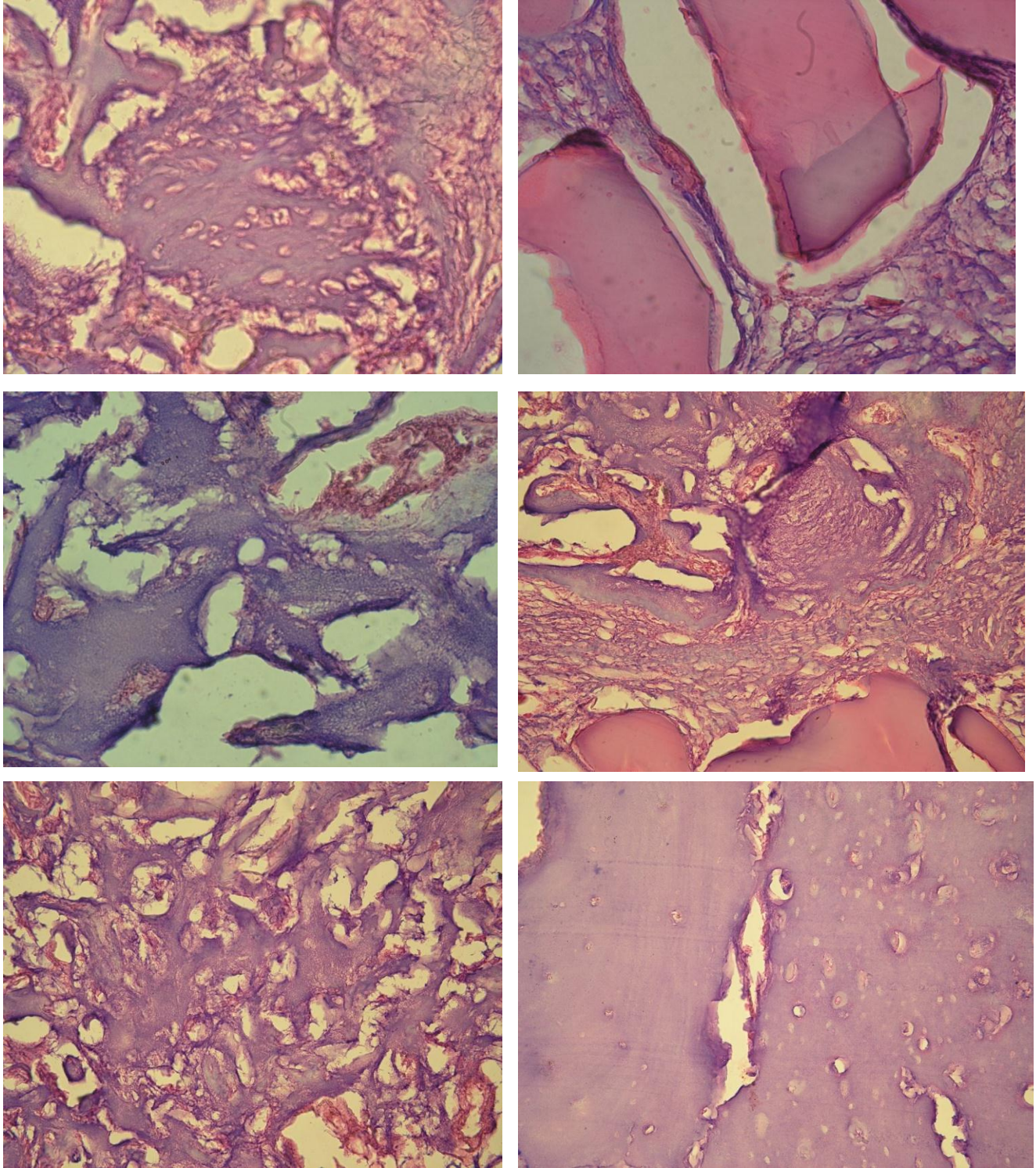


Fig. 26. Cortes histológicos a los 3 meses de realizado el defecto óseo quirúrgico en las tibias experimentales. Se observa la presencia del material, y los distintos niveles de formación y maduración del tejido óseo formado.

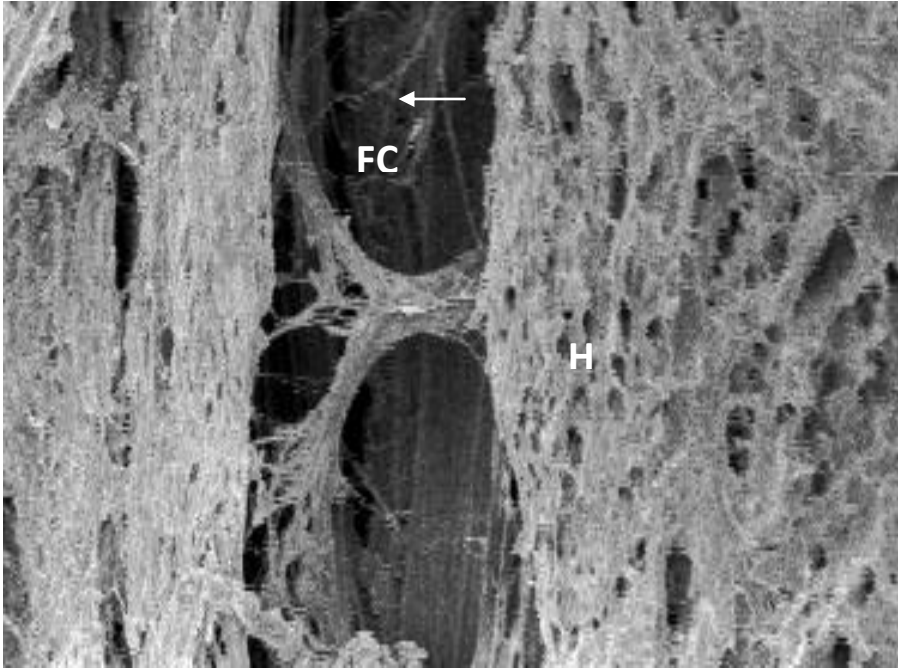


Fig. 27. Tibia control a 1 mes del postoperatorio (150X). Puede observarse el parénquima óseo (H), y formación de fibras colágenas precursoras de nuevo tejido óseo (FC). La cabeza de flecha demuestra la presencia de las fibras neoformadas.

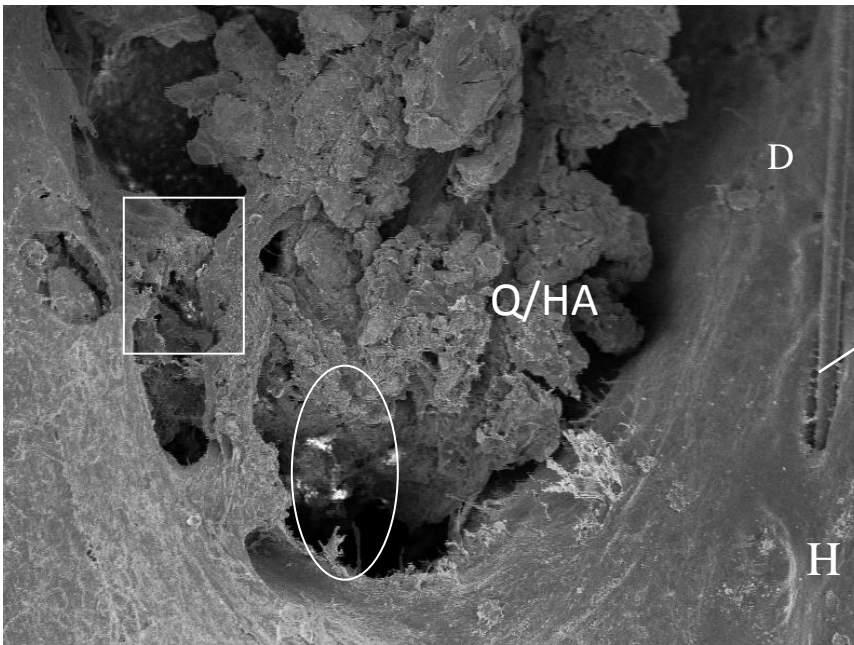


Fig. 28. Tibia experimental al mes del postoperatorio (150X). La letra H delimita el tejido óseo y en el centro el biomaterial implantado (Q/HA) en el defecto óseo (D). El ovalo demuestra la proyección del tejido óseo organizado hacia al biomaterial implantado, el cuadrado permite verificar la inclusión del material dentro del tejido óseo subyacente.



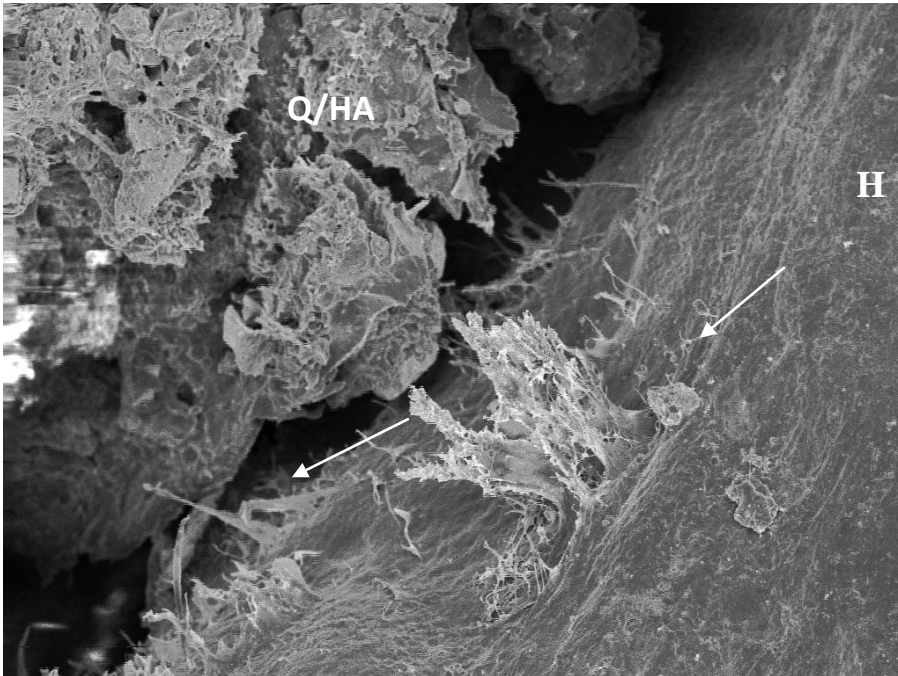


Fig. 29. Corte ultraestructural de tibia experimental al mes del postoperatorio. A una magnificación de 500X las cabezas de las flechas indican la migración de las células óseas hacia el material colocado, además de, el aspecto de atracción que ejerce el material sobre las células del tejido subyacente.

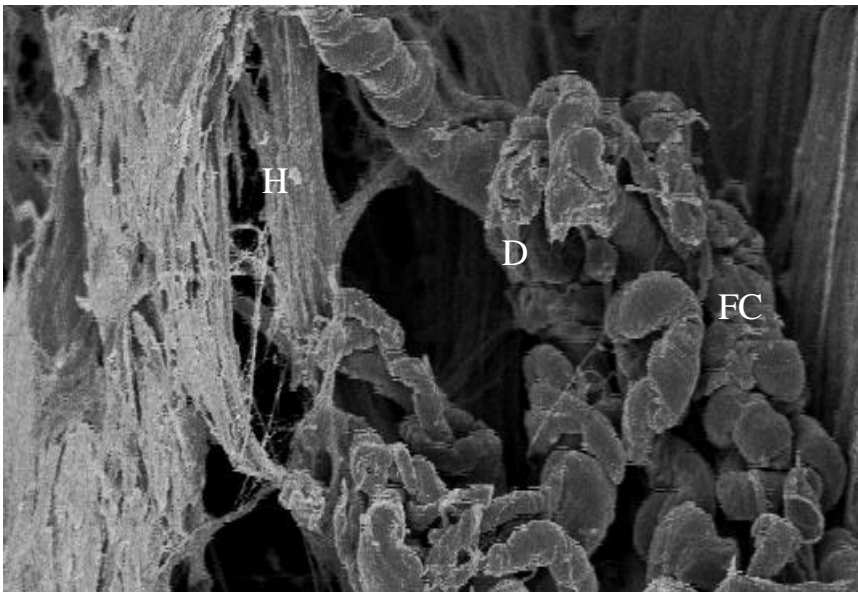


Fig. 30. En esta muestra control a los 3 meses se observa, el tejido óseo (H), y formación de fibras colágenas (FC) que aparecen de forma desorganizada en el centro del defecto (D).

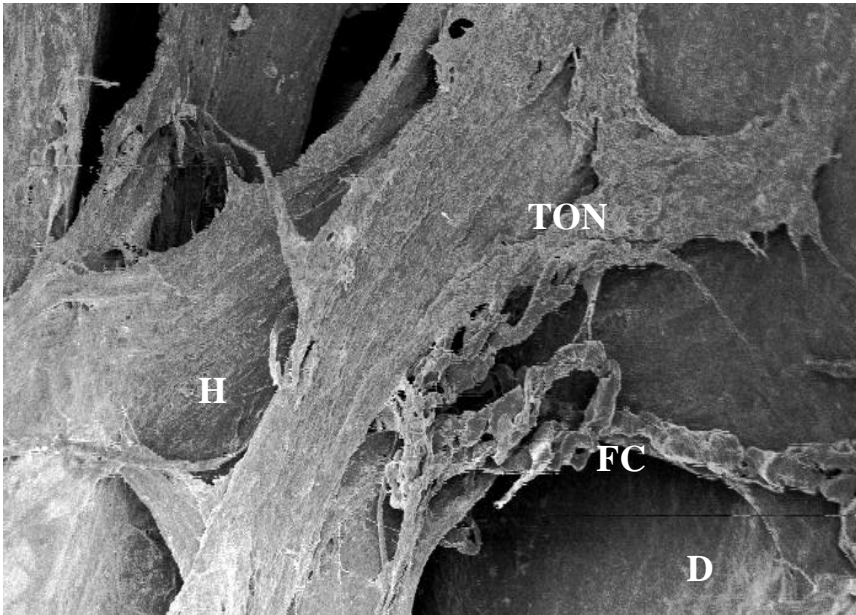


Fig. 31. Tibia experimental 3 meses (150X). Se observa el defecto óseo (D), fibras colágenas organizadas (FC), dando paso al tejido óseo neoformado (TON) con características microscópicas idénticas al original (H).

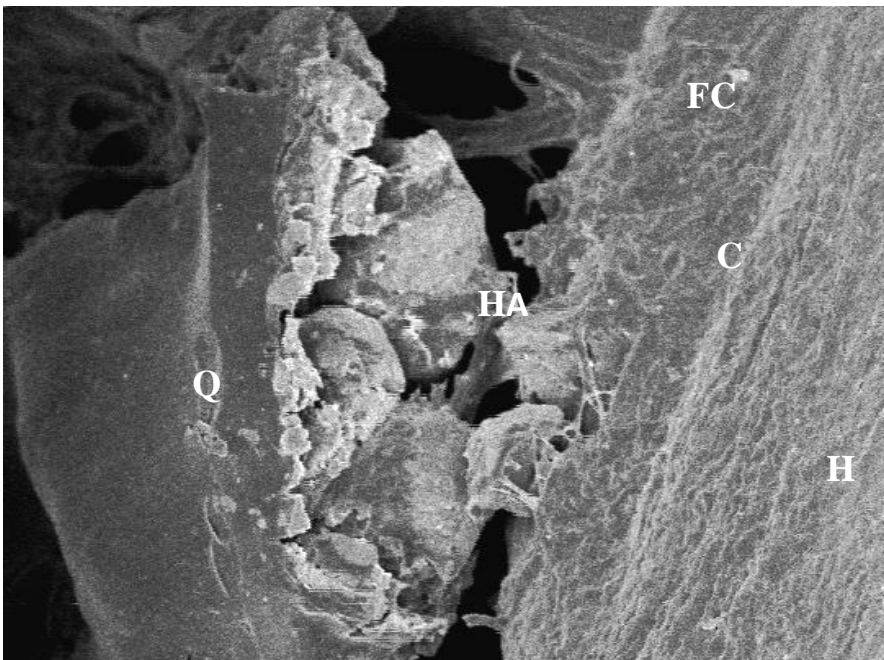


Fig. 32. A una magnificación de 500X en la tibia experimental a los 3 meses se observa en lo profundo del defecto, parte del biomaterial colocado y sus componentes, quitosano (Q) e HA, además se observan el tejido óseo (H) migrando hacia ella, células elongándose al tejido(c) y formación de nuevas fibras colágenas (FC).