



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LAS  
PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA  
POROSA DE POLIPROPILENO FUNCIONALIZADO,  
RECUBIERTO CON QUITOSANO E HIDROXIAPATITA COMO  
POTENCIAL IMPLANTE ÓSEO

**MITZY MELLA MELLA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: M<sup>a</sup> SOLEDAD FERNÁNDEZ GARAY

SANTIAGO, CHILE  
2011



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LAS  
PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA  
POROSA DE POLIPROPILENO FUNCIONALIZADO,  
RECUBIERTO CON QUITOSANO E HIDROXIAPATITA COMO  
POTENCIAL IMPLANTE ÓSEO

**MITZY MELLA MELLA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales

NOTA FINAL: .....

NOTA      FIRMA

PROFESOR GUÍA: M<sup>a</sup> SOLEDAD FERNÁNDEZ GARAY .....

PROFESOR CONSEJERO: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO .....

PROFESOR CONSEJERO: ESTEFANÍA FLORES PAVEZ .....

SANTIAGO, CHILE  
2011

MEMORIA DE TÍTULO

**“PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA POROSA DE POLIPROPILENO FUNCIONALIZADO, RECUBIERTO CON QUITOSANO E HIDROXIAPATITA COMO POTENCIAL IMPLANTE ÓSEO”**

**"PREPARATION AND *IN VIVO* EVALUATION OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF A POROUS POLYMER MATRIX OF FUNCTIONALIZED POLYPROPYLENE COATED WITH CHITOSAN AND HYDROXYAPATITE AS A POTENTIAL BONE IMPLANT"**

**Mitzy Angely Mella Mella \***

\*Departamento de Ciencias Biológicas Animales  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**Financiamiento**  
**FONDECYT 1080185**  
**FONDAP 11980002**

## RESUMEN

El propósito de este estudio fue preparar una matriz polimérica porosa (MPP) a base de polipropileno funcionalizado recubierto con quitosano e hidroxiapatita, evaluar la respuesta del organismo frente a este compósito y establecer su capacidad para inducir osteointegración y/u osteoconducción. Para esto se utilizaron 12 ratas Sprague-Dawley divididas en 6 grupos correspondientes a las 0, 1, 2, 4, 8 y 16 semanas de cicatrización; un defecto óseo de 5x1 mm fue creado en la diáfisis proximal de ambas tibias. En el miembro derecho se implantó el compósito a evaluar y el miembro izquierdo fue el control. Los animales fueron sacrificados mediante cámara de CO<sub>2</sub> y se les realizó un estudio radiográfico e histológico. El compósito implantado no presentó evidencias de reacción a cuerpo extraño y desde la primera semana mantuvo estrecho contacto con el tejido óseo neoformado. Las primeras dos semanas se presentó reacción periosteal masiva que penetró progresivamente los poros del implante, observándose brotes osteogénicos como condensaciones de células mesenquimáticas en un tejido conectivo muy vascularizado y neoformación trabecular dentro de los poros del implante. La neoformación ósea prosiguió y desde la octava semana comenzó la adaptación morfoestructural del hueso nuevo.

Se concluye que la MPP recubierta con quitosano e hidroxiapatita exhibió propiedades osteointegrativas al unirse estructuralmente al hueso y osteoconductoras al presentar adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica dentro de sus poros.

**Palabras claves:** compósito, osteoconducción, osteointegración

## ABSTRACT

The purpose of this study was to prepare a porous polymer matrix (MPP) based on functionalized polypropylene coated with chitosan and hydroxyapatite, evaluate body's response to this composite and establish its ability to induce osseointegration and / or osteoconduction. Twelve Sprague-Dawley rats were used divided into 6 groups corresponding to 0, 1, 2, 4, 8 and 16 weeks of healing; a 5x1 mm bone defect was created in the proximal diaphysis of both tibiae. In the right member the composite to evaluate was introduced and the left member was used as control. Animals were sacrificed by CO<sub>2</sub> chamber and a radiographic and histological study was performed. The implanted composite showed no evidence of foreign body reaction from the first week and maintained close contact with newly formed bone tissue. During the first two weeks a periosteal reaction penetrating the implant pores was observed. Osteogenic buds observed as mesenchymal cells condensations highly vascularized and newly trabecular bone formations

were found within the implant pores. New bone formation was observed until the eighth week after implantation when morpho-structural adaptation was initiated.

It is concluded that MPP coated with chitosan and hydroxyapatite exhibited osseointegrated properties because it's structurally binding to bone and osteoconductive properties due to adhesion, proliferation and differentiation of the osteoblastic cells within their pores.

**Keywords:** composite, osteoconduction, osteointegration.

## 1. Introducción

El tejido óseo es el principal componente del esqueleto y el único capaz de regenerarse totalmente tras una lesión (1, 2). La necesidad de restaurar diferentes tipos de defectos de tejido óseo ha constituido desde hace mucho un importante tema de estudio e investigación para las ciencias médicas. En lugar de usar prótesis implantadas permanentemente para reemplazar los tejidos dañados, el objetivo final de la intervención quirúrgica será implantar “soportes” reconstructivos o regenerativos temporarios que permitan al cuerpo autocurarse (3). El uso de implantes pretende que el nuevo hueso formado sea idéntico al preexistente.

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción. Está conformado principalmente por osteocitos capaces de controlar la remodelación ósea, detectando las variaciones de cargas mecánicas (2).

El remodelado óseo consiste en la reabsorción de una cantidad determinada de hueso llevada a cabo por los osteoclastos, capaces de secretar enzimas lisosomales que degradan la matriz ósea orgánica (4), así como la formación de la matriz osteoide por los osteoblastos y su posterior mineralización. Este fenómeno tiene lugar en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular llamadas “unidades básicas de remodelado óseo” (2).

En la matriz ósea encontraremos iones inorgánicos como calcio, fosfato y carbonato

(en proporción de 10:6:1 respectivamente) formando pequeños cristales de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , además de magnesio, sodio, potasio, manganeso y fluor en bajas cantidades. La materia orgánica (osteoide) posee proteínas colágenas donde 90% son fibras colágenas tipo I. Se sabe que el colágeno juega un rol regulatorio en el crecimiento y diferenciación osteoblásticos (5). Sobre estas fibras colágenas y en el interior de ellas se encuentran cristales fusiformes de hidroxiapatita (HA). Las proteínas no colágenas del osteoide corresponden a proteoglicanos y glicoproteínas tales como osteonectina, proteína morfogénica ósea, fosfatasa alcalina, osteopontina, fibronectina, etc. (6).

La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Tras un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial con hematíes, plaquetas y fibrina. Las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial (2, 7, 8).

Variadas alternativas han sido probadas como soportes óseos, los que poseen

diversas propiedades, entre las que destacan la osteoinducción, la osteoconducción y la osteointegración (9). La osteoinducción corresponde a la habilidad para estimular la proliferación y diferenciación de células madre pluripotenciales (2, 9, 10). La osteoconducción es la habilidad para estimular la adherencia y la migración de células osteogénicas y vasos sanguíneos al interior del implante, permitiendo la colonización ósea en el interior de sus poros. La osteointegración corresponde a la conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie del implante (2, 10). Estudios previos señalan que la osteointegración de los biomateriales, depende en parte de las propiedades del soporte, tales como, carga de superficie, topografía y porosidad apropiada (11).

Los nuevos enfoques hacia el procesamiento de biomateriales poliméricos precisan crear soportes con complejas estructuras y formas macroscópicas, que permitan múltiples alternativas para acomodarse a la estructura tisular (12). Estos soportes o compósitos (material constituido por más de un componente), actúan como sustratos para la adhesión, proliferación y diferenciación celular (11, 13) y son modelados a partir de materiales biodegradables de origen natural como colágeno, ácido hialurónico, etc., polímeros biodegradables como poli (3-ácido hidroxibutírico) -co- (3-ácido hidroxivalérico),

y de polímeros sintéticos tales como poli (ácido poliláctico), poli (ácido glicólico), poli [(ácido láctico-co-ácido glicólico)], etc. Respecto a los soportes bioimplantables, estos deben poseer una microestructura altamente porosa (sobre 90%), poros interconectados y una gran superficie de conducción para el desarrollo de nuevo tejido en crecimiento. Para la regeneración ósea, los tamaños de poros deben oscilar entre 100 y 350  $\mu\text{m}$  (13).

En la actualidad las ciencias veterinarias también utilizan los biomateriales para mejorar la calidad de vida en diferentes especies de animales. Los adhesivos tisulares son muy útiles en el campo de la ortopedia. Algunos se aplican en heridas y permiten una rápida cicatrización (14).

Se han estudiado diversos biomateriales que ayudan a la cicatrización ósea, entre ellos, soportes poliméricos a base de poliéster y polifumaratos capaces de soportar adhesión, crecimiento y diferenciación osteoblástica, sin evidencias de citotoxicidad (11). Comercialmente existe MedPor®, un implante a base de microesferas de polietileno de alta densidad, cuya porosidad permite un rápido crecimiento fibrovascular y de tejidos blandos junto con la final incorporación de hueso (15, 16, 17, 18).

Asimismo se han investigado sustitutos óseos naturales como cáscara de huevo de avestruz (19, 20) y soportes compósito de hidroxiapatita/colágeno, el cual resultó ser

altamente biodegradable y biocompatible (13).

En las últimas décadas ha sido introducida la HA como material útil en distintas reparaciones óseas. Este fosfato de calcio, que se puede obtener de forma sintética, presenta biocompatibilidad, no toxicidad, estabilidad química, osteoconducción y bioactividad. Aunque los biomateriales a base de fosfato de calcio son relativamente “antiguos”, su habilidad para desencadenar la formación ósea es incomparable en relación con otros biomateriales (8). A pesar de que su resistencia a las fuerzas de tensión es baja, sus microporos favorecen la progresiva tendencia a la incorporación y posterior sustitución por hueso del huésped (21). La experimentación con este tipo de material ha reducido los rechazos y ha favorecido la osteointegración, observándose en algunos casos la formación de callo óseo alrededor de la HA (22).

La HA también puede ser empleada en conjunto con quitosano ( $Q_0$ ), un polisacárido catiónico natural que puede ser producido por *N*-desacetilación de quitina. Importantes propiedades de este polímero, tales como biocompatibilidad, resistencia química, fuerza mecánica, propiedades antimicrobianas y estabilidad térmica, han estimulado su uso en biotecnología (23, 24).

Entre los polímeros sintéticos más estudiados se encuentra el polipropileno (PP); una poliolefina sintetizada vía catálisis a partir del propeno que es utilizada en una

amplia gama de productos. La producción industrial de PP ha experimentado un crecimiento extraordinario en la última década debido a su bajo costo, sus buenas propiedades térmicas y mecánicas y su utilización en mezclas poliméricas y compósitos. Sin embargo, este material carece de polaridad, lo que no permite su compatibilización. Una de las rutas utilizadas actualmente para aumentar su polaridad, es la funcionalización mediante reacciones de injerto con un monómero de mayor polaridad en sus cadenas poliolefínicas, utilizando un peróxido orgánico como iniciador radical. Mediante estas reacciones el monómero injertado queda unido covalentemente a la poliolefina como una cadena lateral (25). Los injertos de monómeros polares sobre PP vía reacciones de radicales libres a ganado amplia atracción industrial y ha atraído el interés científico (26).

La presente memoria de título evaluó biológicamente, una matriz polimérica porosa (MPP) a base de PP funcionalizado mediante el injerto de ácido itacónico (AI), recubierta con  $Q_0$  e HA mediante técnica de hidratación. Esta MPP fue desarrollada en el CIMAT de la Universidad de Chile, en el marco del proyecto Fondecyt regular N° 1080185. La hipótesis planteada fue “dado que el  $Q_0$  y la HA se caracterizan por ser altamente biocompatibles, el soporte polimérico reforzado con ambos materiales actuará como un sustrato efectivo para la adhesión, proliferación y diferenciación de



osteoblastos". Adicionalmente se plantearon los siguientes objetivos: a) obtener una MPP a partir de PP funcionalizado con Al 0,7% recubierta con solución de  $Q_0$  e HA; b) evaluar la respuesta frente a la MPP en ratas como modelo animal; c) evaluar la capacidad osteointegrativa de la MPP y d) determinar la existencia de adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica dentro del implante.

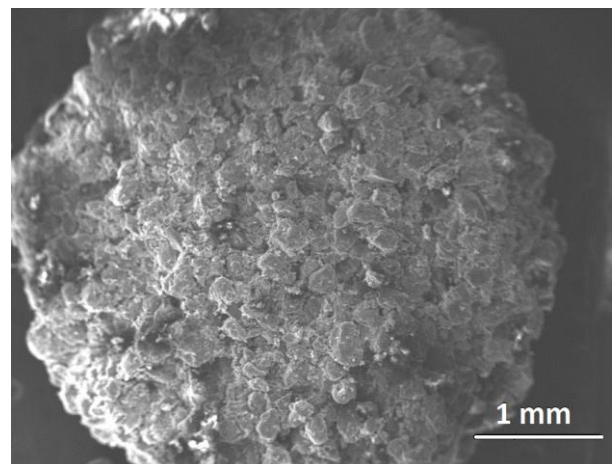
## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Matriz polimérica porosa (MPP)

Siguiendo el protocolo elaborado por el CIMAT de la Universidad de Chile, se pesaron entre 5 – 5,5 g de PP funcionalizado con Al al 0,7% (PP-g-Al 0,7%), suministrado por el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros de la Universidad de Chile. Luego el PP-g-Al 0,7% se disolvió en 100 ml de xileno a 110 °C en un baño maría con agitación constante. Posteriormente se precipitó la solución gota a gota, en 350 ml de metanol frío. El PP-g-Al 0,7% precipitado fue lavado siete veces con agua desionizada (dos litros de agua por lavado), a presión reducida, utilizando un matraz kitasato con embudo de filtración. Luego fue separado y secado a 65 °C por 4 días. Una vez seco, el PP injertado fue pulverizado en un molino criogénico. El polvo resultante fue tamizado con el fin de seleccionar tamaños de partícula entre 150 y 300  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, se pesó 1 g de PP-g-Al 0,7% tamizado y 80 mg de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) como

agente espumante, dividiendo este último en dos porciones de 40 mg cada una; en seguida se vertieron 40 mg de  $\text{NaHCO}_3$  con 1 g de PP injertado, en un molde de acero de 2 x 2 cm compactando la mezcla con un mortero. Posteriormente se esparcieron los 40 mg restantes de  $\text{NaHCO}_3$  en la superficie, sin compactar nuevamente y el molde fue calentado en una mufla a 190 °C durante 20 minutos. Finalmente se obtuvo la MPP tras depositar el molde en un contenedor con agua fría por unos segundos y desmoldar con ayuda de un bisturí.

La MPP fue recubierta mediante sumersión en una solución de  $Q_0$  al 1% en ácido acético al 2% con 0.5% de HA comercial (Sigma Aldrich ®) durante 21 días. La MPP recubierta fue secada a temperatura ambiente, cortada y



esterilizada mediante óxido de etileno por 24 horas en sobres individuales (fig.1).

**Figura 1.** Imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de un compuesto poroso de PP-g-Al 0,7% recubierto con  $Q_0$  e HA.

### 3. Animales experimentales y técnica quirúrgica

#### 3.1 Animales

De acuerdo con la norma ISO 10993, para la evaluación biológica de biomateriales como dispositivos médicos, se ocuparon para el ensayo 12 ratas Sprague-Dawley, hembras, entre 10 y 12 semanas de edad y un peso aproximado de 450 g, procedentes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales se dividieron en 6 grupos de dos individuos cada uno y se mantuvieron en jaulas de dos. El alimento consistió en dieta comercial peletizada y agua de bebida *ad libitum*.

#### 3.2 Procedimiento quirúrgico de implantación del compósito

El procedimiento quirúrgico cuenta con la autorización del Comité de Ética de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias.

Se trabajó bajo protocolo anestésico inhalatorio mediante mascarilla y circuito abierto con isofluorano. Ambos miembros posteriores fueron depilados desde el tercio proximal del fémur hasta el tercio distal de la tibia, desinfectando con clorhexidina 0,5% y alcohol y realizando una incisión longitudinal de piel, desbridamiento de la musculatura cráneo-medial de la tibia y reflexión del periostio. Posteriormente se realizó en todos los animales un defecto rectangular de profundidad suficiente para alcanzar el canal medular en la parte central de la faceta medial proximal de la tibia. El defecto de aproximadamente 5 mm de largo

por 2 mm de ancho, se realizó con un taladro manual y una fresa de 1 mm de diámetro. En cada animal se consideró la tibia derecha como experimental y la tibia izquierda como control. En el defecto cortical del grupo experimental se introdujo el compósito mediante presión digital, posteriormente los tejidos separados fueron suturados con sutura absorbible de ácido poliglicólico 4/0 a punto simple separado. Las tibias del grupo control fueron sometidas al mismo procedimiento pero sin la introducción del compósito en el defecto cortical. Como tratamiento postquirúrgico se administró subcutáneamente: Ketoprofeno 1 mg/kg cada 24 horas por 3 días como antiinflamatorio y antibiótico enrofloxacino cada 24 horas por 7 días. Cada grupo fue evaluado a las semanas 0, 1, 2, 4, 8 y 16 post implante, considerando tiempo cero el periodo inmediato a la conclusión de la cirugía. El sacrificio se realizó mediante cámara saturada de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>).

### 4. Análisis de resultados

#### 4.1 Evaluación imagenológica

Se tomaron vistas radiográficas A-P y L-M de tibia a las 12 ratas postmortem, para determinar la existencia de reacción periosteal, reacción de tejidos blandos y aumento de radiodensidad ósea en el sitio de la lesión como indicativo de formación de callo óseo. Las radiografías fueron observadas en negatoscopio y fotografiadas con cámara digital.

**Tabla 1.** Grados de reacción periosteal y de tejidos blandos observados en el estudio radiográfico.

Semanas	0	0*	1	1*	2	2*	4	4*	8	8*	16	16*
Reacción Periosteal	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	-	-	-
Reacción Tejidos blandos	-	-	-	-	++	-	++	+	++	-	-	-

\* : control

Nula: -

Leve: +

Moderada: ++

Aumentada: +++

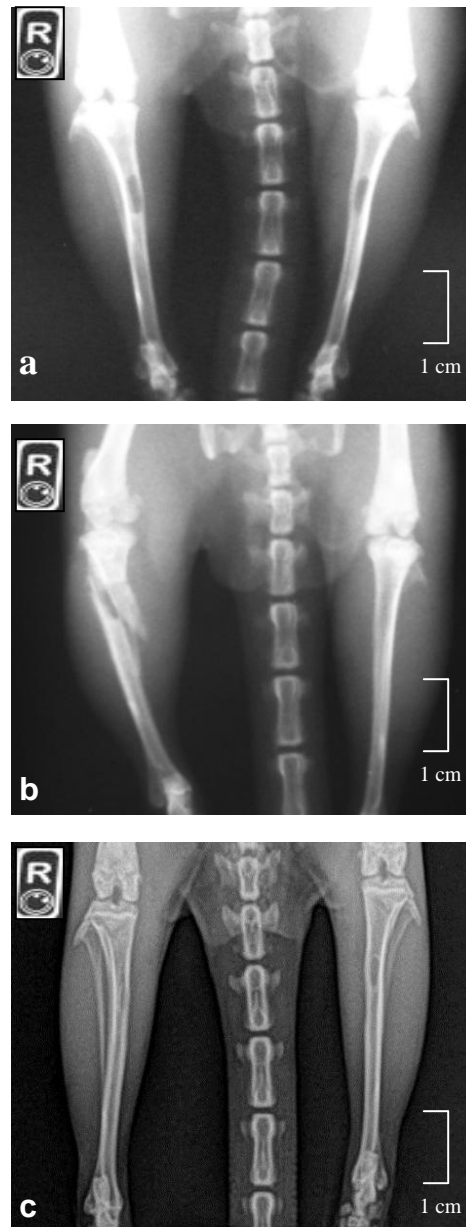
#### 4.2 Evaluación histológica

A las ratas sacrificadas se les extrajo ambos huesos tibiales (experimental y control). Las muestras se fijaron en formalina al 10%, por 5 días; se lavaron con agua y se descalcificaron en solución Ana Morse (27) por 14 días, cambiando el descalcificador diariamente. Posteriormente se procesaron para técnica histológica de rutina usando tinción hematoxilina-eosina y se analizaron bajo microscopio, digitalizando las imágenes en aumentos 4x, 10x, y 40x con una resolución de 2560 x 1920 pixeles mediante una videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E-600) y conectada a una computadora con software morfométrico (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA).

## 5. Resultados

### 5.1 Estudio radiográfico

En todas las placas radiográficas la lesión creada se observó como un defecto lucente de 5 x 2 mm de tamaño, de forma ovalada y márgenes netos. La tabla 1 resume lo observado a lo largo de todo el experimento



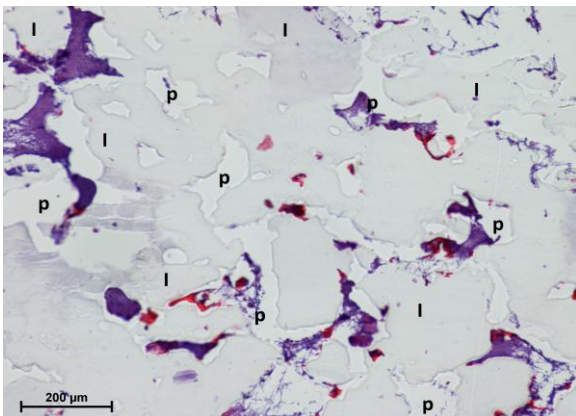
**Figura 2.** Imagen radiográfica antero-posterior de tibias de rata a las 0 (a), 2 (b) y 16(c) semanas post implantación. El defecto del miembro derecho (R) fue relleno con el compuesto y el izquierdo corresponde al control.

en cuanto a reacción periosteal y de tejidos blandos. En el caso de la segunda y octava semanas post implante, se detectó en el miembro experimental, la presencia de una línea de fractura en tercio diafisiario tibial proximal con evidencia de discreta reacción periosteal amorfa tipo callo óseo. Respecto al aumento de radiodensidad ósea en el sitio de la lesión como indicativo de formación de callo óseo, ésta se observó a partir de las cuatro semanas, sugiriendo algún grado de remodelación (fig. 2).

### 5.2 Estudio histológico

Los sitios de los defectos óseos quirúrgicamente inducidos en ambos grupos de tibias (control y experimental) no presentaron evidencias de infección postquirúrgica.

Al microscopio el compósito implantado se observó de un tono azul-violeta claro con espacios irregulares que varían entre 50 y 300  $\mu\text{m}$  de diámetro a lo largo de su superficie y que corresponden a los poros del compósito (fig. 3).



**Figura 3.** Imagen microscópica de un corte histológico del implante (I) de PP-g-Al 0,7% recubierto con Qo e HA donde se puede observar su gran porosidad (p). Hematoxilina- eosina, 10x.

En la primera semana post implantación se observó moderada actividad periosteal dentro y alrededor del compósito. Se pueden ver condensaciones de células mesenquimáticas formando brotes osteogénicos y algunos focos de neoformación ósea donde se aprecian trabéculas inmaduras adyacentes a las corticales del hueso (fig. 4 e y f). El control presentó moderada reacción periosteal con condensaciones de tejido mesenquimático y trabéculas óseas en su interior (fig. 4 d).

En la segunda semana postquirúrgica se observó el compósito ocupando casi el 100% del espacio medular. La reacción periosteal fue mayor que la observada en la semana uno al igual que la invasión de los poros. Conjuntamente se presentó neoformación ósea trabecular y un elevado grado de resorción en las corticales del hueso (fig. 5 b y c). Su control evidencia moderada reacción periosteal con gran cantidad de trabéculas inmaduras formándose en su interior (fig. 5 a).

A las cuatro semanas el compósito implantado se encontraba completamente rodeado e invadido por periostio, ocupando casi la totalidad de la cavidad medular y se evidenció cierto grado de disgregación del mismo. Se observaron brotes osteogénicos junto con algunos vasos sanguíneos en el interior de los poros del compósito (fig. 5 e y f). En el control se observó un considerable grado de regeneración con abundante activación periosteal en la zona cortical afectada y neoformación trabecular en la

cavidad medular. El defecto cortical comienza a ser regenerado, observándose tejido óseo inmaduro organizándose en laminillas (fig. 5 d).

A las 8 semanas post implantación los poros del compósito se encuentran repletos de células periosteales apreciándose abundantes brotes osteogénicos junto con algunos capilares llenando los espacios. También se evidenció matriz no calcificada hacia la periferia del defecto óseo, y trabéculas inmaduras que cruzan de un lado a otro el compósito implantado seccionándolo en dos partes. Además, dentro de los poros se observaron pequeños focos en donde el hueso neoformado se encontraba completamente mineralizado. En resumen, a las 8 semanas el compósito implantado aparentemente disminuyó su tamaño respecto a los tiempos anteriores y sus poros se encontraban rellenos de brotes osteogénicos y trabéculas óseas de hueso inmaduro con diferentes grados de mineralización (fig. 6 b y c). El control mostró una avanzada regeneración de la cortical del hueso con neoformación ósea trabecular en la cavidad medular (fig. 6 a).

Alcanzada la decimosexta semana se presentó gran cantidad de hueso trabecular dentro del compósito implantado, acompañado de abundante matriz osteoide. El compósito se observó de menor volumen

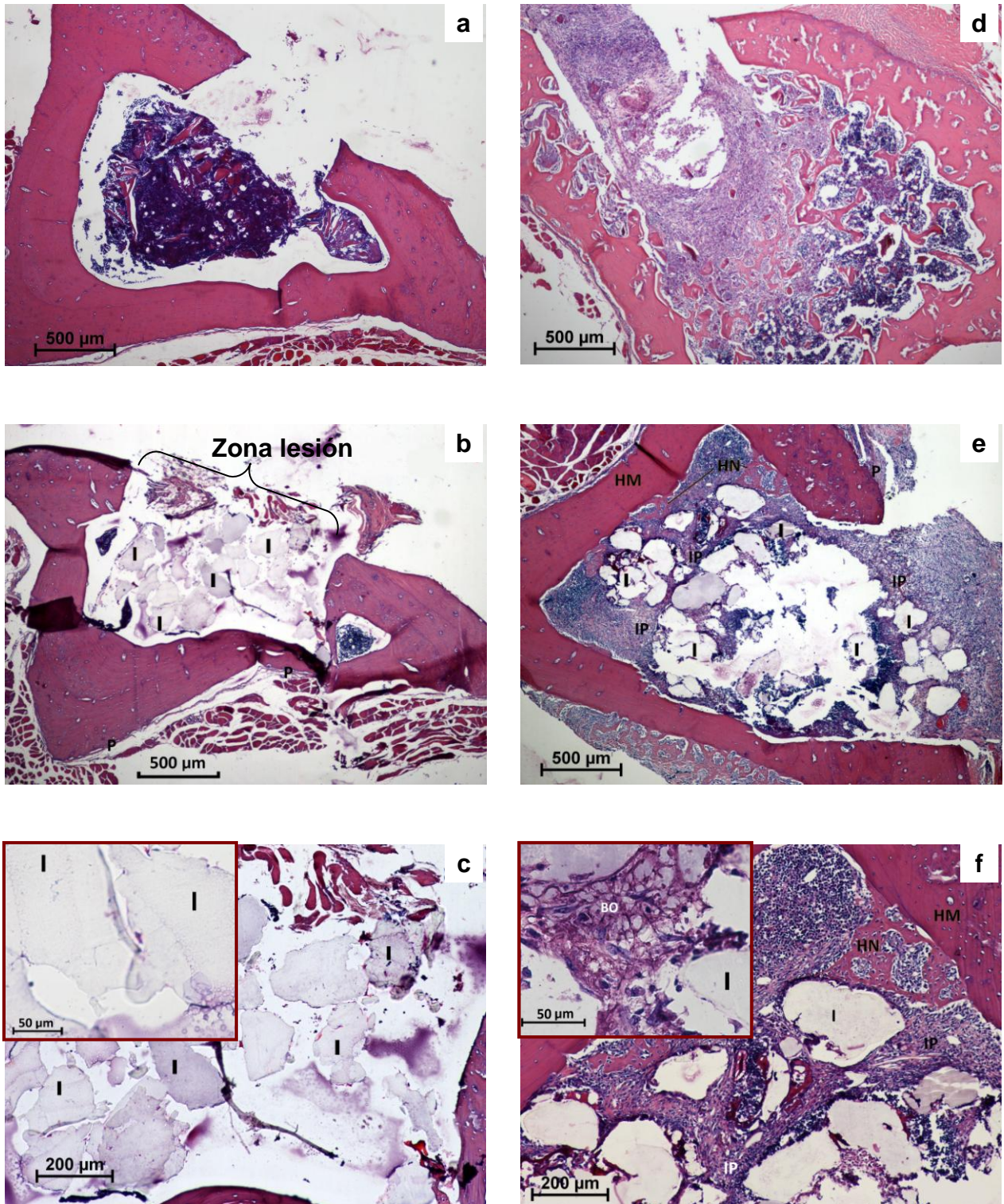
y la continuidad de la cortical del defecto se encontraba casi completamente restaurada (fig. 6 e y f). El control mostró regeneración casi total de la cortical afectada sin presencia de hueso trabecular en la cavidad medular. El hueso neoformado se encontraba totalmente organizado adoptando la típica disposición laminar de hueso compacto (fig. 6 d).

## 6. Discusión

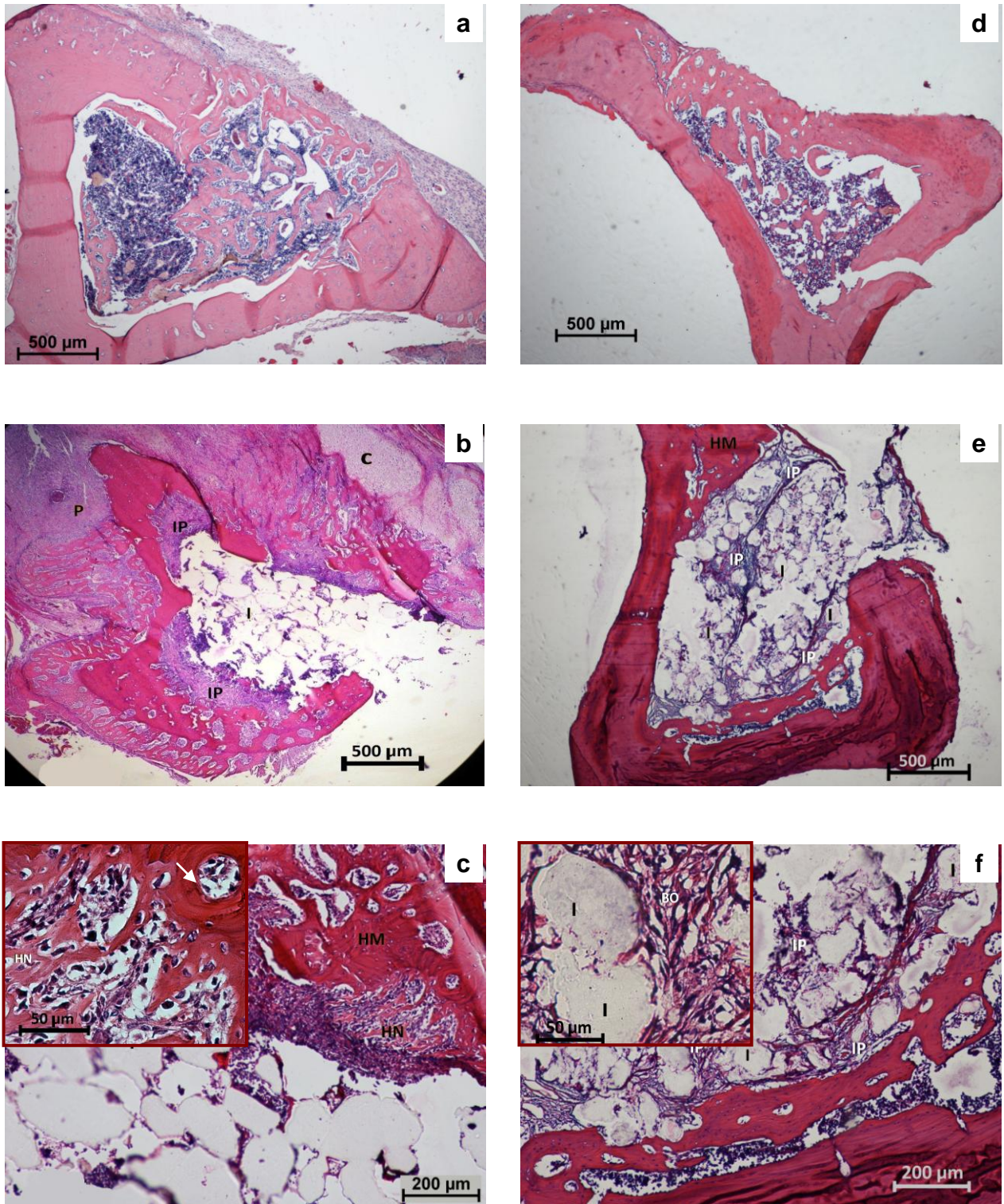
Los resultados de este estudio demostraron que el implante a base de de PP-g-Al 0,7% recubierto con  $Q_0$  e HA fue parcialmente reabsorbido por el organismo sin presentar reacciones a cuerpo extraño por lo menos hasta las 16 semanas, permitiendo además la neoformación ósea al interior de sus poros, sugiriendo que posee un potencial para ser utilizado como implante óseo.

Dado que este compósito posee características mecánicas reducidas, su uso esta destinado a sectores anatómicos que no estén sometidos a cargas mecánicas considerables, en otras palabras, este implante puede ser utilizado para rellenar principalmente defectos craneofaciales.

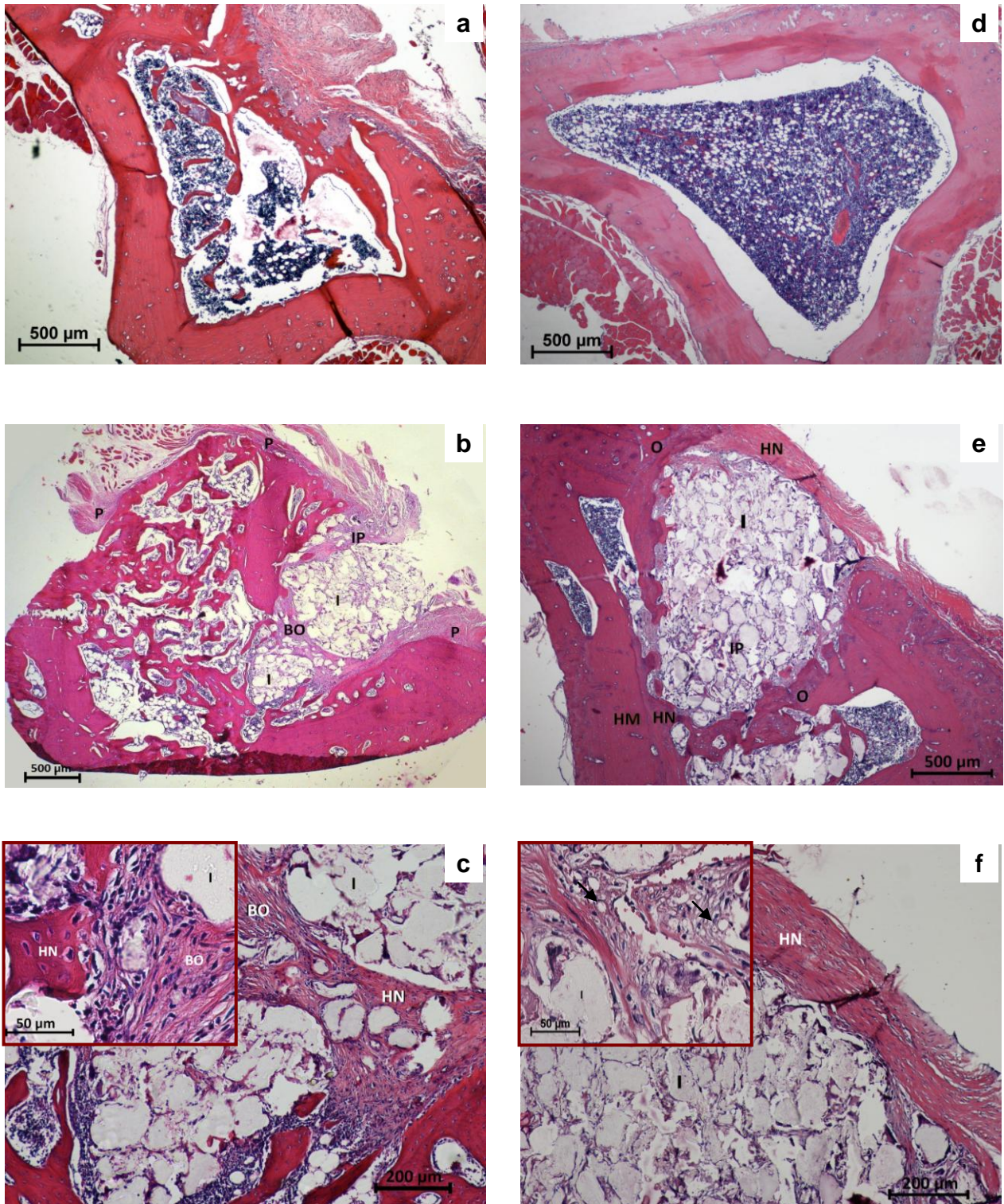
En base a los objetivos planteados se optó por la tibia como sitio experimental para minimizar las consecuencias postoperatorias que implica una intervención en zonas tan delicadas como el cráneo.



**Figura 4.** Imagen microscópica de cortes histológicos transversales de tibia descalcificada de rata sin implante (control) a las 0 (a) y 1 semanas (d) y con implante (experimental) a las 0 (b,c) y 1 semanas (e, f) de implantación. Se puede observar que alrededor del implante de PP-g-Al 0,7% (I) el periostio (P) se encuentra reactivo y hay invasión celular de los poros (IP) del implante y formación de brotes osteogénicos (BO). Se observa además neoformación ósea (HN) adyacente a las corticales del hueso maduro (HM) en la primera semana. Tinción Hematoxilina-eosina. Magnificación original 4x (a, b, d, e); 10x (c, f) y 40x (insertos).



**Figura 5.** Imagen microscópica de cortes histológicos transversales de tibia descalcificada de rata sin implante (control) a las 2 (a) y 4 semanas (d) y con implante (experimental) a las 2 (b, c) y 4 semanas (e, f) de implantación. Se pueden observar algunos vasos sanguíneos (flecha), reacción del periostio (P) e invasión de los poros (IP) del implante con formación de brotes osteogénicos (BO) y formación de hueso nuevo (HN) adyacente a las corticales del hueso maduro (HM). También se ve cartílago (C) en el caso de la segunda semana post implante. Tinción Hematoxilina-eosina. Magnificación original 4x (a, b, d, e); 10x (c, f) y 40x (insertos).



**Figura 6.** Imagen microscópica de cortes histológicos transversales de tibia descalcificada de rata sin implante (control) a las 8 (a) y 16 semanas (d) y con implante (experimental) a las 8 (b, c) y 16 semanas (e, f) de implantación. Se pueden observar algunos vasos sanguíneos (flechas), reacción del periostio (P) e invasión de los poros (IP) del implante con formación de brotes osteogénicos (BO) y abundante matriz osteoide (O) que posteriormente se calcifica y forma hueso nuevo (HN). La cortical afectada esta siendo regenerada. Tinción Hematoxilina-eosina. Magnificación original 4x (a, b, d, e); 10x (c, f) y 40x (insertos).



Los resultados no evidenciaron reacciones adversas exceptuando dos casos en que hubo fractura del hueso experimental lo que presumiblemente podría atribuirse al manejo postoperatorio de los ejemplares. Los controles demostraron en todos los casos que los animales presentaban capacidad regenerativa normal; descrita por Landry en 1996 (28), evidenciándose una regeneración cortical y medular casi completa a las 16 semanas.

Respecto a la aceptación que tuvo el organismo hacia el compósito implantado, podría atribuirse en un 100% al recubrimiento de  $Q_0$  e HA, ambos materiales caracterizados por ser altamente biocompatibles; propiedad definida por la Sociedad Europea de Biomateriales, en 1987, como la habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta al huésped, en una aplicación específica (29).

El  $Q_0$  ha sido estudiado para regeneración de cartílago y piel y ha demostrado ser satisfactoriamente biocompatible, pero sus cualidades para soportar cargas mecánicas siguen siendo cuestionables (8). El  $Q_0$  es estructuralmente similar a los glicosaminoglicanos presentes en los tejidos conectivos y está compuesto por residuos de d-glucosamina al igual que estos, lo que explica por qué es tan bien aceptado por el organismo (8). La HA por su parte, al contener calcio y fosfato exhibe excelentes propiedades para unirse al hueso, relacionadas con la reactividad de

superficie, creando una capa mineralizada interfacial entre el implante y el tejido óseo que asegura su cohesión. Además, ambos componentes se degradan naturalmente y los productos que resultan de esta degradación son completamente metabolizados por el organismo (8).

El estudio de los mecanismos que rodean la adhesión celular sobre nanofases cerámicas, revela que estas cerámicas adsorben significativas cantidades de vitronectina (proteína de adhesión celular) que pueden contribuir selectivamente a una mayor adhesión de osteoblastos. La mayor adhesión de osteoblastos es independiente del tipo de superficie química del material, pero depende de la topografía, específicamente del tamaño de los poros (8), lo que explica de alguna manera la existencia de actividad osteogénica al interior del implante. Además de esto, el implante también presentó notables características de osteointegración y osteoconducción, evidenciadas por la rápida y completa invasión de células periosteales en el interior de sus poros, la que se observó a partir de la primera semana y fue incrementando hasta el final del estudio.

Alcanzadas las semana 8 y 16 se observó una unión implante-hueso muy estrecha ya que se formó tejido óseo maduro incluso dentro del implante.

Considerando que este compósito está diseñado para tratar defectos craneofaciales, se debe tener en cuenta también, como lo han demostrado diversos

estudios en ratas y conejos (5,19, 20), que las lesiones de los huesos craneanos presentan un tamaño crítico de regeneración que oscila entre 5 y 8 mm de diámetro, lo que impide extrapolar completamente el comportamiento de este compuesto a defectos de tal naturaleza, además creemos que sus capacidades osteoconductiva y osteointegrativa podrían verse favorecidas por las características estructurales que posee la porción trabecular de los huesos craneanos, ya que al ser rica en redes de vasos sanguíneos garantiza un adecuado aporte nutritivo a las células, existiendo una gran superficie en contacto con el compartimento medular, el cual es una fuente extra no solo de células progenitoras mesenquimáticas sino también de células angiogénicas. Adicionalmente, una correcta distribución de cargas sobre el implante, permite el remodelado óseo, que induce la formación de un estrato óseo dentro del implante (10). En relación a las deficientes capacidades mecánicas del implante, éstas podrían asociarse a los casos donde se presentó fractura, lo que le habría impedido al hueso soportar la fuerza producida por el peso del animal, sin embargo si esto fuera así, deberían haberse fracturado todos los grupos experimentales, incluyendo los controles. Cabe destacar que en estos casos los resultados histológicos evidencian fuerte actividad osteogénica desde el periostio produciéndose osificación tanto directa como indirecta. La formación de tejido cartilaginoso se explicaría debido a

la existencia de la fractura en el miembro implantado ya que al recibir un traumatismo y fracturarse un hueso, los vasos sanguíneos que corren a través de los conductos de Havers se rompen en el sitio de la fractura, produciéndose inmediatamente una hemorragia local interna e incluso externa, la cual se extiende hacia el periostio, canal medular y tejidos blandos adyacentes formando un hematoma y posteriormente un coágulo. Este suceso está estrechamente relacionado con el grado de oxigenación del tejido dañado ya que al ser la oxigenación tan escasa, ocasiona que se inicie la formación de callo a distancia de la línea de fractura, precisamente en donde el hueso se encuentre sano, el periostio empieza a producir hueso a distancia y así las células mesenquimáticas se diferencian en condroblastos que inicialmente formaran cartílago, esto se debe a que la irrigación sanguínea aún no es muy adecuada. En cambio cuando el oxígeno es suficiente la actividad osteoblástica a partir del periostio basta para iniciar directamente la osificación (2, 30).

Respecto a las variaciones de masa del implante y a sus fragmentaciones observadas en los cortes histológicos, parece haber cierta correlación de masa versus tiempo de implantación, lo que sugiere que está siendo degradado por el organismo sin presentar reacciones de rechazo ya que no se observó encapsulación ni manifestaciones de dolor

evidente. A pesar de que no está del todo claro el mecanismo de la biodegradación del implante en este estudio, parece ser que el periodo de observación de 16 semanas es demasiado corto para estimar su biodegradación.

## 7. Conclusiones

Se ha demostrado que la MPP a base de PP-g-AI 0,7% recubierta con materiales altamente biocompatibles como el Q<sub>6</sub> y la HA presenta propiedades osteointegrativas al unirse estructuralmente al hueso y osteoconductoras al presentar adhesión, proliferación y diferenciación de tejido óseo dentro de sus poros a partir de la primera semana de implantación.

En tibia de ratas existe una buena respuesta tisular frente al compuesto implantado, gracias a la biocompatibilidad otorgada por el recubrimiento, y a la porosidad inducida, que permitió un mayor contacto entre el implante y el neohueso favoreciendo tanto la osteoconducción como la osteointegración.

El compuesto evaluado cumple con varios requisitos deseables para un implante, demostrando potencial para ser utilizado como sustituto óseo, pero estudios previos hechos en nuestro laboratorio (31) indicaron que posee baja resistencia mecánica inicial, lo que limita su uso a lugares que no estén sometidos a cargas mecánicas elevadas.

Tras cuatro meses de seguimiento el implante parece haber disminuido su masa

inicial, siendo este periodo de tiempo insuficiente para estimar su biodegradación.

## 8. Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT n° 1080185) y el Fondo de Financiamiento de Centros de Excelencia en Investigación (FONDAP n° 11980002). Se agradece al Dr. Ignacio Arias por su labor en los procedimientos quirúrgicos, a M<sup>a</sup> Paz Díaz por su colaboración en la preparación de la MPP y a la Dra. M<sup>a</sup> Soledad Fernández por su apoyo y supervisión durante la realización de la presente memoria de título.

## Referencias

1. **FERNANDEZ-TRESGUERRES, I., ALOBERA, M., PINGARRÓN, M., BLANCO, L.** 2006. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral Patología Oral Cirugía Bucal* 11: 47-51.
2. **DAVIES, J.E.** 2003. Understanding peri-implant endosseous healing. *Transfer of Advances in Sciences into Dental Education*. 67: 1-20.
3. **KOHN, J., WELSH, W., KNIGHT, D.** 2007. A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials. *Biomaterials* 28: 4171-4177.
4. **GENESER, F.** 2000. Histología. Tejido esquelético. 3<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana. pp.263-297.
5. **DUPOIRIEUX, L., POURQUIER, D., PICOT, M. C., NEVES, M.** 2001. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 30: 58-62.
6. **COLOMA, J. L., ROS, C., CASTELO-BRANCO, C.** 2009. Osteoporosis. *Fisiología y Patología*. *Revista Centroamericana de Obstetricia y Ginecología* 14: 178-187.
7. **CRUESS, R. L., DUMONT, J.** 1985. Healing of bone. *Textbook of Animal Orthopedics*. En línea: <[http://www.ivis.org/special\\_books/ortho/chapter\\_03/ivis.pdf](http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_03/ivis.pdf)> [consulta: 22-11-2010]

8. **BARRÉRE, F., MAHMOOD, T.A., DE GROOT, K., VAN BLITTERSWIJK, C.A.** 2008. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. *Materials Science and Engineering* 59: 38-71.
9. **VALLE, M.J., FEIJOO, M., CRESPO, R.** 2003. Estimuladores de la osteogénesis. *Acta Ortopédica Castellano-Manchega*. 4: 53-57.
10. **GUERCIO, E., DINATALE, E.** 2009. Consideraciones estructurales y biológicas en la oseointegración. *Revisión de la literatura*.47: 1-7.
11. **CORTIZO, M. S., MOLINUEVO, M. S., CORTIZO, A.** 2008. Biocompatibility and biodegradation of polyester and polyfumarate based-scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2: 33-42.
12. **GRIFFITH, L. G.** 2000. Polymeric biomaterials. *Acta materialia*. pp 263-277.
13. **LI, X., FENG, Q., JIAO, J., CUI, F.** 2005. Collagen based scaffolds reinforced by chitosan fibres for bone tissue engineering. *Polymer International* 54: 1034-1040.
14. **VALDEZ, B., SCHORR, M., VALDEZ, E., CARRILLO, M.** 2005. Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano. *Ciencia y Desarrollo*. En línea: <<http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/ArticulosCompleto/pdf/Biomateriales.pdf>> [consulta: 22-05-2011]
15. **COULDWELL, W.T., CHEN, T.C, WEISS, M.H., FUKUSHIMA, T., DOUGHERTY, W.** 1994. Cranioplasty with the Medpor porous polyethylene Flexblock implant. Technical note. *Journal of Neurosurgery* 81: 483-486.
16. **COULDWELL, W.T, STILLERMAN, C.B, DOUGHERTY, W.** 1997. Reconstruction of the skull base and cranium adjacent to sinuses with porous polyethylene implant: preliminary report. *Skull base surgery* 7: 57-63.
17. **LIU, J., GOTTFRIED, O., COLE, CH., DOUGHERTY, W., COULDWELL, W.** 2004. Porous polyethylene implant for cranioplasty and skull base reconstruction. *Neosurgical Focus* 16: 1-5.
18. **WELLISZ, T., DOUGHERTY, W., GROSS, J.** 1992. Craniofacial applications for the Medpor porous polyethylene Flexblock implant. *Journal of craniofacial surgery* 7: 57-63.
19. **DUPOIRIEUX, L.** 1999. Ostrich eggshell as a bone substitute: a preliminary report of its biological behaviour in animals – a possibility in facial reconstructive surgery. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 37: 467-471.
20. **DURMUS, E., CELIK, I., OZTURK, A., AYDIN M.** 2003. Evaluation of the potential beneficial effects of ostrich eggshell combined with eggshell membranes in healing of cranial defects in rabbits. *The Journal of International Medical Research* 31: 223-230.
21. **ZUBILLAGA I., SÁNCHEZ G., MONTALVO J.J.** 2007. Reconstrucción craneal con biomateriales. Revisión histórica y estado actual. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial* 29: 79-89.
22. **TOTUSAUS X.,** 2010. Hidroxiapatita como material de relleno en defectos óseos. *Portal Veterinario MEVEPA Chile*. En línea: <<http://www.mevepa.cl/modules.php?name=News&file=article&sid=675>> [consulta: 22-05-2010]
23. **PANG, X., ZHITOMIRSKY, I.** 2007. Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite-chitosan coatings. *Materials Characterization* 58: 339-348.
24. **SHEPHERD, R., READER, S., FALSHAW, A.** 1997. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal* 14: 535-542.
25. **YAZDANI-PEDRAM, M., CALDERON, K., QUIJADA, R.** 2000. Funcionalización de polipropileno en solución mediante injerto de monometil itaconato. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 45: 269-282.
26. **LÓPEZ-MANCHADO, M.A., KENNY, J.M., QUIJADA, R., YAZDANI-PEDRAM, M.** 2001. Effect of grafted PP on the properties of thermoplastic elastomers base on PP-EPDM blends. *Macromolecular Chemistry and Physics* 202: 1909-1916.
27. **MORSE, A.** 1945. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *Journal of Dental research* 24: 143-153.
28. **LANDRY, P., MARINO, A., SADASIVAN, K., ALBRIGHT, J.** 1996. Bone injury response. *Clinical Orthopaedics* 332: 260-273.
29. **MARTINEZ, C., MORENO, F.** 2005. Biocompatibilidad. *Fundamentos en Biomateriales de uso Odontológico*. En línea: <[http://www.colombiaaprende.edu.co/html/media/teca/1607/articles-111883\\_archivo.pdf](http://www.colombiaaprende.edu.co/html/media/teca/1607/articles-111883_archivo.pdf)>[consulta: 22-05-2011]
30. **MALLADI, P., XU, Y., CHIOU, M., GIACCIA, A., LONGAKER, M.** 2006. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 290: 139-146.
31. **NEIRA-CARRILLO, A., FERNÁNDEZ, M. S., ARIAS, J. L., NAVARRETE, S., DÍAZ, M. P., YAZDANI-PEDRAM, M.** 2011. Preparation of a porous scaffold based on polypropylene grafted with monomethylitaconate as potential bone graft. *Macromolecular Research*, Vol 19.

