



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“EFECTO DEL IMPLANTE DE UN COMPÓSITO EN BASE A
QUITOSANO, SOBRE LA REGENERACIÓN ÓSEA”

CHRISTEL DENISE CUNEO HELLBERG

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

PROFESOR GUÍA: MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ GARAY

PROYECTO FONDAP 11980002

**SANTIAGO, CHILE
2008**



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“EFECTO DEL IMPLANTE DE UN COMPÓSITO EN BASE A QUITOSANO, SOBRE LA REGENERACIÓN ÓSEA”

CHRISTEL DENISE CUNEO HELLBERG

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ
PROFESOR CONSEJERO:	JOSÉ LUIS ARIAS
PROFESOR CONSEJERO:	GINO CATTANEO

SANTIAGO, CHILE
2008

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quiero dedicar con mucho amor esta Memoria de Título a mi esposo, hija y familia, los cuales fueron un apoyo fundamental durante la realización de esta tesis. Gracias por su paciencia y cariño.

En segundo lugar quiero agradecer con especial énfasis a mi profesora guía la Dra. María Soledad Fernández Garay, por ser una excelente profesora, por su dedicación, cariño y comprensión en todo momento. Estoy muy contenta de haber tenido la suerte de trabajar con ella, ya que siempre tuvo el tiempo y la preocupación para ayudarme en lo que necesitara.

En tercer lugar le quiero agradecer al Dr. José Ignacio Arias Fernández, que fue mi profesor co-tutor y fue quien me ayudo y apoyo en todas las cirugías ortopédicas realizadas. Además siempre es agradable trabajar con alguien tan bien preparado y con las ganas de enseñar como el Dr. J.I Arias.

Me gustaría también agradecer a los otros profesores que trabajaron en esta tesis por el tiempo y los conocimientos aportados, como el Dr. Carlos González, que fue el encargado de evaluar las muestras histológicas y al Dr. Daniel Saez encargado de interpretar las radiografías.

Además agradecer a toda la gente que trabaja en el laboratorio de Ciencias Biológicas y en especial a Cynthia Ortiz y Evelyn Albornoz por su colaboración y simpatía.

Por último agradecer al Proyecto FONDAP por el apoyo económico que permitió realizar esta tesis.

ÍNDICE

PÁGINAS	
I. RESUMEN	3
II. SUMMARY	4
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
V. HIPÓTESIS	17
VI. OBJETIVOS	18
VII. MATERIAL Y MÉTODO	19
VIII. RESULTADOS	23
IX. DISCUSIÓN	63
X. CONCLUSIONES	69
XI. BIBLIOGRAFÍA	70

I. RESUMEN

El mejor candidato para ser usado como implante óseo es el propio hueso, ya sea obtenido como autoinjerto o aloinjerto óseo. Sin embargo, sus reconocidas limitaciones han impulsado el desarrollo de variados biomateriales, potencialmente útiles para la sustitución ósea. El objetivo de este trabajo fue probar un nuevo implante desarrollado en base a una cerámica, la hidroxiapatita y un polímero natural, el quitosano. Juntos formaron un compósito poroso y multilaminar que fue implantado en primera instancia en subcutáneo de ratas para evaluar su respuesta tisular. Los resultados histológicos en subcutáneo de ratas mostraron una inflamación moderada a leve y la continua biodegradación del implante. En segunda instancia se efectuaron lesiones de 4 mm en tibias de conejos y se implantó el compósito, al cual previamente se le adicionaron células troncales pluripotenciales, y factores de crecimiento, necesarios para la regeneración. Los resultados mostraron que este implante es capaz de estimular la formación de hueso favoreciendo la osteoconducción, osteointegración, osteoinducción. El compósito fue lentamente biodegradado en la medida que el nuevo hueso se formó, lográndose la regeneración ósea a las 16 semanas de implantado en las tibias de conejo.

II. SUMMARY

The best candidate for use as a bone implant is the bone itself, either obtained as autograft or allograft. However, recognized its limitations have prompted the development of various biomaterials, potentially useful for bone replacement. The aim of this study was to test a new implant developed on the basis of a ceramics, hydroxyapatite and a natural polymer, the chitosan. Together they formed a porous multilaminar composite that was implanted in first instance in subcutaneous rat tissue to assess their response. The results in rats subcutaneous show a moderate to mild inflammatory reaction and the continued degradation of the implant. In the second instance 4 mm injuries in rabbit's tibias were done where composites were introduced, previously pluripotenciales stem cells and growth factors were added, which are necessary for regeneration. The results showed that this implant is capable of stimulating bone formation promoting osteoconduction, osseointegration and osteoinducción. The composite was slowly biodegraded insofar that new bone was formed, achieving bone regeneration in rabbit's tibia at 16 weeks post implanted.

III. INTRODUCCIÓN

Los problemas relacionados con los huesos, son un tema de gran impacto social, ya que conforme ha ido progresando la humanidad y la población se hace más longeva, nuestros huesos, sufren las enfermedades típicas por déficit de tejido o mala calidad ósea.

La enfermedad ósea más común es la osteoporosis, afecta a una de cada 5 mujeres y produce un gran número de fracturas cada año. Además, existen otras patologías que causan pérdidas de tejido óseo y fracturas, como por ejemplo, los tumores óseos, los problemas articulares, los accidentes de tráfico y las guerras. Por lo tanto, es de gran importancia generar implantes óseos para la regeneración del hueso y de esta manera suplir la gran demanda existente (Salamanca y Santiago, 2004).

El hueso dañado es capaz de regenerarse por medio de la formación de un tejido exactamente igual al original. De esta manera, cuando se presentan soluciones de continuidad, por cualquiera de los problemas planteados se activan de inmediato los mecanismos formadores de hueso, con la finalidad de restaurar el tejido óseo. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, en pérdidas mayores de tejido óseo se hace necesario desarrollar diferentes sistemas para la regeneración y reparación de defectos óseos recurriendo así al uso de implantes óseos (Sanzana, 2006).

El mejor implante óseo es el hueso, ya sea proveniente del propio paciente, como es el caso del autoimplante, o bien obtenido de un donante de la misma especie, como cuando se emplea un aloimplante. Sin embargo, ambos tipos de implantes poseen reconocidas limitaciones, como la escasez de donantes, la transmisión de enfermedades y además la cantidad a recolectar puede ser insuficiente. Es así como ninguno de los tratamientos convencionales ha podido suplir todas las necesidades a la hora de tratar problemas relacionados con la pérdida o deterioro del tejido óseo; por lo tanto, se hace necesaria la búsqueda de soluciones alternativas, hecho que ha llevado a numerosos grupos de investigadores a trabajar en el desarrollo, formulación y síntesis de variados biomateriales que pueden ser de utilidad para la sustitución ósea (Sanzana, 2006).

Nace así, la “Ingeniería de tejidos”, la cual se define como el uso de los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos, y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función. Para lograr esto, utiliza matrices tridimensionales (sustrato), células osteogénicas y factores de crecimiento (Falke y Atala, 2000).

Otra técnica ocupada hoy en día es la Regeneración ósea guiada que utiliza materiales de relleno o de exclusión, para que el nuevo hueso ocupe el lugar que le corresponde y el espacio no sea invadido por otro tipo de tejido que retardaría la regeneración (Vaserman, 2004).

Entre los materiales de mayor interés para reconstruir defectos óseos, se encuentran los biomateriales cerámicos, debido a sus reconocidas propiedades osteoconductoras, comprobada biocompatibilidad, capacidad de biodegradación, disponibilidad cuantitativamente ilimitada y condiciones apropiadas para ser empleados como moldes para la ingeniería de tejidos. A este grupo pertenece la hidroxiapatita coralina que es utilizada como reemplazo de hueso o como cobertura para implantes. Presenta diversas aplicaciones en el campo de la traumatología, ya que en su estructura presenta calcio y fósforo, los dos elementos del componente inorgánico del hueso, lo que la hace un excelente biomaterial para ser usado como implante óseo (Totusaús, 2005).

Otros materiales que se utilizan como sustitutos óseos son los polímeros. El segundo polímero más abundante en la naturaleza es la quitina, obtenida de los caparzones de crustáceos, que mediante desacetilación se obtiene su derivado quitosano. El quitosano posee múltiples propiedades, como por ejemplo su biodegradabilidad e inocuidad en diferentes tejidos, esto lo hace útil para ser usado como sustrato para implantes óseos (Arias, 2007).

El progresivo desarrollo de las técnicas de análisis y caracterización de materiales ha favorecido en los últimos años la elaboración de compósitos, es decir, materiales que resultan de la combinación de cerámicas, metálicos y/o polímeros. Es por esto, que la utilización de hidroxiapatita con quitosano para formar un biocompósito, más factores de crecimiento y células osteogénicas como posible sustituto óseo es nuestro desafío.

En la presente Memoria de título nos planteamos como objetivo principal la implantación de un nuevo compuesto a base de quitosano e hidroxiapatita, para valorar su utilidad y respuesta de regeneración en defectos óseos y así contribuir a dar solución a los numerosos problemas del sistema esquelético.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El hueso posee una resistencia a la tensión similar a la del hierro, pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible. Es el principal componente del esqueleto adulto y posibilita la acción mecánica de la musculatura, protege órganos vitales y alberga la médula ósea hematopoyética. El hueso sirve además de reservorio de calcio, fósforo y otros iones. En relación con su función, los huesos del esqueleto presentan formas y tamaños diferentes, pero poseen una estructura común: una corteza de hueso compacto (80% del volumen total de hueso) que por su superficie interna se halla en continuidad con un hueso de aspecto esponjoso o trabecular (20% del volumen total de hueso). En el interior del hueso compacto existe una red de finos canales longitudinales (canales de Havers) y transversales (canales de Volkmann) a través de los cuales se distribuyen los vasos y nervios, que posibilitan su nutrición e inervación. La unidad estructural del hueso compacto es la osteona, en la cual laminillas concéntricas se organizan formando estructuras cilíndricas (Getty, 1982).

En el hueso se encuentran tres componentes principales: inorgánico, orgánico y células especializadas. La matriz inorgánica es la fase mayoritaria y está compuesta principalmente por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita. La matriz orgánica está constituida en un 90% por colágeno tipo I y el 10% restante está formado por proteínas no colágenas, otros tipos de colágeno, lípidos y otras macromoléculas. Las proteínas no colágenas como los factores de crecimiento y citoquinas, proteínas osteoinductivas, osteonectina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, proteoglicanos, otras fosfoproteínas y fosfolípidos, representan una pequeña cantidad en cuanto al volumen total del hueso, pero contribuyen enormemente a las funciones biológicas de éste (Fernández –Tresguerres *et al*, 2006). La matriz orgánica del hueso determina la estructura, las propiedades bioquímicas, mecánicas, la flexibilidad y resistencia a la tensión, mientras que la matriz inorgánica le confiere dureza, rigidez y resistencia a la compresión. El tercer componente son las células especializadas compuestas por células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Getty, 1982).

El tejido óseo es uno de los tres órganos con la capacidad de regenerarse a sí mismo, de manera completa, a través de un proceso similar al que tiene lugar durante la embriogénesis. La regeneración tisular es la respuesta orgánica, que trae consigo la

restitución del tejido tras un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial con características distintas al original. La regeneración de defectos en el tejido óseo, está influenciada por diferentes factores entre los cuales se pueden mencionar el tipo de hueso, es decir, si se trata de hueso cortical o trabecular, el lugar y el grado de severidad de la fractura o defecto, el grado de fijación durante el período de curación, la especie y la edad del individuo (Fernández –Tresguerres *et al*, 2006).

La regeneración ósea origina una respuesta que puede dividirse en tres etapas. Una fase inflamatoria, luego una fase proliferativa o de reparación y finalmente una fase de remodelación. Tras un trauma o fractura se produce un coágulo que interrumpe la oxigenación de las células óseas, lo que lleva a su muerte. Se inicia la fase inflamatoria que dura 1 a 3 días y que trae consigo la vasodilatación y edema de la zona afectada, generando el hematoma inicial con glóbulos rojos, plaquetas y fibrina. Las células del coágulo liberan interleukinas y factores de crecimiento originando la migración de células mesenquimáticas pluripotenciales, linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares. Se inicia luego la fase reparativa, que tiene una duración de 1 a 60 días y culmina con la generación del callo óseo primario. En esta fase, el hematoma se organiza inmovilizando la fractura y permitiendo que las células reparativas mesenquimáticas pluripotenciales se diferencien hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplaza el hematoma. Todo esto está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. El periostio forma rápidamente hueso, a través de osificación directa o membranosa que utiliza células mesenquimáticas. En la zona de la fractura entran células reparativas y brotes capilares. Luego se forma el callo, que está constituido por tejido fibroso, cartilaginoso y hueso inmaduro, otorgando a la zona mayor estabilidad. En seguida, ocurre la osificación endocondral, en la cual el cartílago es reemplazado por hueso, organizándose en capas concéntricas y mineralizándose a través del depósito de cristales de hidroxapatita. Se logra así, una mayor inmovilización de la zona. La última fase y la más larga con una duración de 4 a 6 meses es la fase de remodelación. Ocurre una reabsorción osteoclástica que deja un trabeculado, que luego es invadido por osteoblastos. Los osteoclastos son los encargados de remover el hueso inmaduro que es reemplazado por hueso definitivo (Cruess y Dumont, 1985; Fernández -Tresguerres *et al*, 2006).

Histológicamente, durante la fase de regeneración ósea luego de ocurrida una fractura, es posible observar formación de neo hueso en forma de islotes que luego son removidos y reemplazados por hueso definitivo mediante remodelación osteoclástica (Gartner *et al*, 2002).

Radiográficamente es posible observar la regeneración ósea a través de placas, pudiendo evidenciar la formación de callo óseo primario, aumento de la radiodensidad ósea en el sitio de la lesión y continuidad de las corticales diafisarias (Morgan y Leighton, 1995).

En algunas ocasiones, el proceso fisiológico de regeneración del hueso puede no cumplir con los requerimientos y calidad deseada, como por ejemplo, en el caso que existan fracturas conminutas, con pérdidas de tejido óseo, unión retardada o en el caso más grave, la no unión de fracturas. Para muchos de estos casos es necesario intervenir para ayudar a restablecer el equilibrio del hueso y así evitar que el tejido mesenquimático pueda “ganarle” espacio a la formación de tejido óseo. Con el fin de obtener, la formación predecible de un hueso de la calidad requerida, se ha desarrollado una técnica denominada Regeneración ósea guiada (ROG). Para lograr la regeneración ósea, se utilizan un conjunto de sustitutos que actuarán como materiales de relleno y/o de exclusión. Técnicamente se busca rellenar la cavidad en cuestión o producir un aumento de volumen, con hueso o un sustituto del mismo y aislar la zona a recuperar, utilizando membranas de exclusión. Las barreras de exclusión son las que establecen una separación entre el mesénquima y la zona de neoformación ósea. Los materiales de relleno o aumentos de volumen son implantes óseos, que se definen como todos los tejidos o materiales que puedan emplearse para rellenar defectos del hueso, con el objetivo de conseguir la regeneración del tejido óseo y la consolidación de la fractura, respetando la anatomía original lo más posible y recuperando al mismo tiempo el máximo de su funcionalidad (Vaserman, 2004; Braun y Ruter, 1996).

Hoy en día, el desarrollo de nuevos sustitutos y de técnicas de regeneración ha obligado a la complementación de conocimientos provenientes de dos áreas muy distintas: la ciencia de los materiales y la biología. De esta manera surge la “Ingeniería de tejidos” que puede ser considerada una ciencia en sí misma. Se encarga del desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener e inducir el crecimiento de tejidos. Incorpora siempre tres elementos básicos para la creación de biomateriales: un sustrato, células troncales

pluripotenciales y factores de crecimiento ocupados en el proceso de regeneración del hueso (Nerem, 1991). El reto de la ingeniería de tejidos óseos, es diseñar matrices tridimensionales capaces de imitar las propiedades naturales del hueso, para proporcionar una ayuda temporal en la regeneración y balancear la degradación, pérdida de propiedades mecánicas con el crecimiento y formación de hueso. Si se optimizan estos aspectos, podríamos esperar que las alternativas sintéticas simulen de manera precisa las propiedades del hueso natural (Arias, 2007).

Ahora bien, para que un implante óseo sea ideal debe cumplir con propiedades esenciales que aseguran su éxito, las cuales son las mismas que deben satisfacer las matrices tridimensionales para la Ingeniería de tejidos. Debe estar disponible, ser biocompatible, tener propiedades de superficie, tener bajo costo, propiedades mecánicas, ser biodegradable y fácilmente esterilizable. La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material de funcionar con una respuesta apropiada y un uso específico en su hospedero. Para que un material sea biocompatible, debe tener cuatro propiedades que son: osteointegración, que dice relación con el anclaje estable y directo entre el implante y el hueso implantado (Albrektsson y Johansson, 2001); osteoinducción, que es la capacidad de reclutar células osteogénicas para la formación de neohueso; osteoconducción, que es la capacidad de neovascularización y así crecer en una superficie o plano y, por último, el implante debe tener inmunotolerancia, que es la compatibilidad inmunológica (Ratner *et al*, 2004).

Las propiedades de superficie, tanto las químicas como topográficas pueden controlar, afectar la adhesión y proliferación celular. Las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material. Las propiedades topográficas son fundamentales para la osteoconducción, ya que de esta forma las células osteogénicas migran a la superficie de la matriz tridimensional a través del coágulo de fibrina, que se establece después de implantado el material (Mauney *et al*, 2005).

Con respecto a las propiedades mecánicas del implante este debe resistir a fuerzas de compresión, tensión y flexión igual a las que soporta el hueso. Cabe recordar, que la principal característica mecánica de los huesos es ser porosos (débiles) por dentro y sólidos (fuertes) por fuera. Los implantes deben poseer tamaños de poros e interconexiones que permitan la colonización tanto de neo-vascularización (nuevos capilares sanguíneos) como

de células óseas (migración y adhesión de células osteoblásticas y osteoclasticas). Las microporosidades e interconexiones permiten además la difusión de nutrientes y gases junto con la remoción de metabolitos propios de la actividad celular (Yang *et al*, 2001). Otra característica biomecánica muy importante y hasta ahora poco explorada, es la que muestra el hueso cortical, la multilaminaridad. Éste, al estar formado por capas concéntricas de colágeno fibrilar mineralizado dispuestas ortogonalmente, posee resistencia biomecánica superior a la de sus componentes por separado. Este fenómeno de adición de fuerzas se puede observar al ver estructuras ingenieriles como lo son las maderas terciadas, láminas de grafito usadas en la fabricación de raquetas de tenis o en los cascos de los grandes yates de competición y las estructuras de avionetas ultra-livianas (Arias, 2007).

Otra propiedad fundamental es la biodegradabilidad, que se define como la destrucción gradual de un material mediada por un sistema biológico. Por una parte, la degradación constituye un mecanismo útil para eliminar el biomaterial después de haber concluido su función a través de una vía natural. En segundo lugar, la degradación también ofrece la oportunidad de que pueda conseguirse un proceso de curación óptimo, con la recuperación total de la funcionalidad del sistema fisiológico, ya que una tendencia natural del organismo, es la capacidad que desarrolla para adaptarse a su entorno (Falke y Atala, 2000).

De acuerdo con todo esto, podemos reconocer dos tipos fundamentales de implantes, los injertos y los sustitutos óseos. Los injertos óseos, se han utilizado en medicina durante muchos años y corresponden a fragmentos de hueso que se pueden implantar en un área del esqueleto, para restaurar la masa ósea perdida. Se pueden clasificar de acuerdo a su procedencia en autoimplantes, aloimplantes y xenoimplantes. Los autoimplantes son aquellos transplantados desde el mismo paciente y son el más completo y mejor candidato para usarse como implante. Algunas ventajas de los autoimplantes son que tienen un máximo potencial de osteogénesis, al proporcionar células troncales totipotenciales; una buena osteoinducción, al entregar factores de crecimiento como son las proteínas de matriz ósea no colágenas; una adecuada osteoconducción, dada por los minerales y colágeno del hueso y una excelente osteointegración. Presentan, además, una temprana respuesta de regeneración ósea y son histocompatibles con el sistema inmunológico del huésped. Sus desventajas son que, para su recolección, se debe realizar

una incisión diferente que puede ser un riesgo para el mismo paciente, aumentando el tiempo de cirugía y la pérdida de sangre, hay riesgos de infección, la cantidad a recolectar de hueso puede ser insuficiente y presentan una baja resistencia mecánica (Ratner *et al*, 2004).

Los aloimplantes son huesos transplantados entre pacientes de la misma especie. Presentan una respuesta similar a los autoimplantes, con la diferencia que la respuesta de osteogénesis demora unas 2 semanas más. Los antígenos celulares de los aloimplantes pueden ser reconocidos como extraños por el sistema inmunológico del receptor y generar su rechazo. Pueden ser transplantados de un dador o sacado de un banco de huesos lo que facilita su recolección en cuanto a cantidad, forma, tamaño y resistencia biomecánica. Algunas de las desventajas son que pueden acarrear contaminantes, toxinas e incluso infecciones al paciente trasplantado, por lo cual, deben ser tratados por procesos como congelación, desecación, autoclave, preservación química o irradiación. Estos procesos limitan su actividad celular, propiedades mecánicas y aumentan su capacidad inmunogénica al degradar proteínas colágenas y no colágenas. El último tipo son los xenoimplantes, que son huesos transplantados de otra especie. Estos tienen la peor respuesta de osteogénesis y pueden causar una reacción generalizada de rechazo (Piermattei y Flo, 1997).

Los sustitutos óseos, son aquellos destinados a implantarse en un organismo para reemplazar o restaurar tejidos vivos y sus funciones. Se definen como un implante natural, sintético o compuesto para reemplazar tejido óseo, sus funciones o permitir la regeneración de él (Ratner *et al*, 2004).

Dentro del campo de los sustitutos óseos, hay una gran variedad de productos. Hay implantes metálicos como el acero inoxidable o aleaciones de titanio, cerámicos como la hidroxiapatita, yeso o vidrios, polímeros como el quitosano, colágeno o hidrogeles y compósitos de cualquiera de estos productos (Ratner *et al*, 2004).

Los materiales metálicos tienen como ventajas su gran resistencia, alta durabilidad, ser inertes y no transmisores de enfermedades y como desventajas, tienen un alto costo, poca flexibilidad y baja osteointegración. Los compósitos metálicos presentan mejor osteointegración, mejor fijación del implante y mejor tolerancia biológica, pero aún así son caros y necesitan mayor tecnología (Ratner *et al*, 2004).

Los cerámicos tienen un amplio uso y dentro de los implantes basados en compuestos cálcicos la más estudiada y utilizada, ya que muestra los mejores resultados en la curación ósea, es la hidroxiapatita (HAP). La HAP sirve como reemplazo de hueso o como cobertura para implantes (Ratner *et al*, 2004). Tiene una estructura tridimensional muy parecida al hueso. Esto junto con su composición química, la convierte en un excelente sustituto de la matriz ósea (Totusaus, 2005). Es uno de los principales elementos estructurales del componente inorgánico del hueso, presentando una relación calcio: fósforo de 1,67. La HAP puede ser natural derivada del coral marino, en los que por un proceso de intercambio hidrotermal, el carbonato cálcico de sus esqueletos es transformado en fosfato de calcio, o puede ser sintética. Hay diferentes formas de utilizar la HAP: en bloques, porosa o en gránulos sólidos. Se ha demostrado con la experimentación, que la HAP es biocompatible, ya que presenta excelente actividad osteoconductora, osteoinductora y osteointegradora (Karageorgiou y Kaplan, 2005). Además, no genera rechazo, es de fácil manipulación, se minimizan las infecciones, el material se mantiene en el lugar de la implantación sin sufrir modificaciones ni reabsorciones, su costo es relativamente bajo y gracias a sus poros interconectados que proporcionan suficiente permeabilidad, puede crecer tejido conectivo y hueso (Totusaus, 2005). Esta forma porosa debe tener un tamaño de poro óptimo de 100 a 150 μm para que el crecimiento del hueso hacia el interior de este material se produzca mejor y así actúe como un andamio-guía absorbible para la reparación del hueso (Ratner *et al*, 2004). Se ha probado también la mezcla de la HAP con otros materiales para mejorar sus propiedades mecánicas. Uno de ellos es el quitosano, que al ser mezclado con HAP mejora las características de adhesión celular y control de la porosidad, pero no las de soporte mecánico (Zhang y Zhang, 2004).

Siguiendo con los tipos de sustitutos óseos, los polímeros, se definen como “toda sustancia orgánica compuesta por un conjunto de monómeros (unidades repetitivas)”. Dentro de los polímeros se encuentra el quitosano (Ratner *et al*, 2004). El quitosano es un derivado de la quitina, la cual es una molécula fibrilar de gran tamaño, constituida básicamente por monómeros de N-acetilglucosamina (polisacárido parecido a la celulosa), que al ser química y mecánicamente muy resistente, no puede degradarse en agua. Por ese motivo, es necesario cambiar su estructura y peso molecular para obtener el quitosano, que es soluble, sin color, olor, ni sabor. El quitosano, a su vez, es un polisacárido catiónico

inocuo, que posee propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad y gracias a su superficie hidrofílica y naturaleza catiónica, promueve la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Además, es fácilmente procesado como película, láminas, cubos, sustratos porosos y posee actividad antimicrobiana afectando a bacterias, hongos y levaduras (Miyazaki *et al*, 1981). Esta última propiedad ha sido ampliamente descrita en la literatura científica, sobre todo en estudios basados en experimentos *in vitro*. Un reciente estudio informa que el quitosano puede ser un buen regenerador de cartílago, ya que las células son capaces de anclarse a esta matriz gelatinosa, lo que es esencial en lesiones condrales (Serrano, 2007). Otros estudios ponen de manifiesto también la efectividad del quitosano como antioxidante, por su habilidad de quelar iones metálicos implicados en la catálisis de las reacciones oxidativas (Miyazaki *et al*, 1981).

Los materiales cerámicos y los polímeros tienen como ventaja que no inducen respuesta inflamatoria a cuerpo extraño, presentan compatibilidad física y mecánica con el tejido receptor, estabilidad en fluidos corporales, no transmiten enfermedades y resisten los procesos de esterilización (Ratner *et al*, 2004).

Tomando en cuenta las propiedades antes mencionadas del quitosano, resulta interesante evaluar el efecto de un compuesto desarrollado en base a quitosano e HAP de forma multilaminar y porosa como implante óseo. Por otra parte, el uso de la técnica de Regeneración ósea guiada y de la triada de la Ingeniería de tejidos aumentará la biocompatibilidad del compuesto a probar en la regeneración ósea.

V. HIPÓTESIS

Dado que el quitosano y la HAP han probado ser individualmente buenos estimuladores de la regeneración ósea, la combinación de éstos en un compuesto multilaminar, adicionado de factores de crecimiento y células osteogénicas logrará condiciones de biocompatibilidad necesarias, para obtener una regeneración guiada de nuevo hueso, al ser utilizado como osteoimplante.

VI. OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar un biocompósito multilaminar como implante óseo.

ESPECÍFICOS

- Evaluar histológicamente la respuesta tisular a la presencia del biocompósito en subcutáneo de rata a diferentes tiempos de implantación.
- Evaluar histológicamente la biocompatibilidad del biocompósito, como implante óseo, en tibias de conejos.
- Comparar el grado de regeneración ósea en hueso con y sin el biocompósito como implante óseo en tibias de conejos.
- Evaluar histológicamente la biodegradación del compuesto en diferentes tiempos, tanto en subcutáneo de ratas, como en la lesión ósea de conejo.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

a) Biocompósito multilaminar

El biocompósito multilaminar probado *in vivo*, fue previamente obtenido en el laboratorio de biomateriales biocerámicos (CIMAT). Está constituido por capas concéntricas de quitosano poroso de alto peso molecular al 2% (Aldrich®) disuelto en ácido acético al 5%, mezclado con 5% de HAP pura (Sigma®), funcionalizado con grupos fosfato y mineralizado mediante doble difusión con acetato de calcio y fosfato de potasio (Merck®). Previo a la implantación, los biocompósitos fueron lavados, liofilizados, cortados y esterilizados mediante óxido de etileno (OE) por 24 horas en sobres individuales.

b) Animales

1) Ratas:

De acuerdo con el protocolo experimental dispuesto por la norma ISO 10993, para la evaluación biológica de biomateriales como dispositivos médicos, se procedió a hacer una evaluación previa de la posible respuesta del huésped al biocompósito, implantando trozos del biocompósito subcutáneamente, en ratas. Se ocuparon 12 ratas (Sprague-Dowley), hembras, de 200 a 300 g, que se dividieron en 5 grupos de 2 individuos cada uno y fueron evaluadas en pares las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante. Se mantuvieron en jaulas de 2 individuos y se alimentaron con dieta comercial peletizada y agua de bebida *ad libitum*. Las ratas fueron sacrificadas mediante cámara saturada de anhídrido carbónico (CO₂) a las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante. Una de las ratas restantes fue sacrificada para la obtención de matriz ósea para ser usada como control positivo de mineralización para ser comparado con algún efecto de mineralización ectópico paradójal que pudiera presentarse por la presencia de hidroxiapatita en el implante. Para esto, se procedió a limpiar los huesos, desmineralizarlos en ácido clorhídrico (HCl) 0,2 N por 48 horas, cortarlos con bisturí, liofilizarlos por 24 horas y finalmente esterilizarlos en sobres individuales. La otra rata fue utilizada como tiempo 0.

2) Conejos:

También de acuerdo con la norma ISO 10993 correspondió como segunda etapa implantar trozos del biocompósito en lesiones óseas. Para esto se utilizaron 6 conejos (Neozelandés), hembras adultas, con un peso de 2.500 a 3.000 g, que se mantuvieron en jaulas individuales y fueron evaluados las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante. Se alimentaron con dieta comercial peletizada y agua de bebida *ad libitum*. Los conejos fueron sacrificados mediante inducción anestésica con Isoflurano y luego inyectados con una solución de Cloruro de Potasio al 20% vía endovenosa. El otro conejo fue utilizado como tiempo 0.

MÉTODO

a) Procedimiento de implante del compuesto

a.1) Pruebas de implantes multilaminares *in vivo* en subcutáneo de ratas:

Se trabajó bajo protocolo anestésico inhalatorio mediante mascarilla y circuito abierto con Isoflurano. Se depiló el sitio de incisión y desinfectó con clorhexidina 0,5%. Se realizaron 4 incisiones sagitales de 1 cm sobre el lomo, formando bolsillos subcutáneos. En 2 de los bolsillos se colocó un cubo del laminado de tamaño 4 x 4 mm pre-esterilizado con OE y se fijó mediante sutura de nylon 4/0. Luego se cerró la piel con puntos simples discontinuos con el nylon antes mencionado. Los dos bolsillos restantes se utilizaron como control positivo, para lo cual, se implantó un cubo de matriz de hueso de rata desmineralizada en HCl 0,2 N lavada en buffer fosfato salino (PBS), congelado en nitrógeno líquido, liofilizado y esterilizado en OE. Luego se cerró igual que los otros bolsillos (Lee *et al*, 2000).

a.2) Pruebas de implantes multilaminares *in vivo* en tibias de conejo:

Se trabajó bajo protocolo anestésico inhalatorio mediante mascarilla y circuito abierto con Isoflurano. El segmento tibia-peroné para implantar el compuesto fue establecido en tibia derecha el implante y tibia izquierda el control. Se depiló la zona de la cresta tibial derecha y se desinfectó con solución de clorhexidina al 0,5%. Se realizó una incisión longitudinal de piel, subcutáneo y tejido muscular hasta llegar a hueso. Se procedió

a escindir con un trocar de 4 mm la cresta tibial. Desde este portal se extrajo mediante una jeringa de 5 mL con aguja de 19 G, aspirado de médula ósea y sangre que fueron colocados en un tubo de toma de muestra estéril. El implante fue introducido en el tubo y luego mediante presión negativa realizada con jeringa de 30 mL, se favoreció que el implante multilaminar fuera embebido de aspirado de médula ósea y así la solución penetró en las porosidades. Luego, el implante multilaminar fue introducido en la lesión de 4 mm realizada en la cresta tibial. Posteriormente, se procedió a suturar, tanto tejido muscular como subcutáneo con sutura reabsorbible de ácido poliglicólico 4/0 con punto simple discontinuo, para luego cerrar piel con nylon 4/0 con el mismo punto. La tibia izquierda del conejo se usó como control, para lo cual se realizó la lesión de 4 mm con el trocar y se cerró sin implante de la manera antes mencionada. Como manejo post operatorio, cada conejo recibió ketoprofeno (Ketofen 1%) en dosis de 1mg/kg durante 3 días, esto para aliviar el dolor y inflamación.

b) Análisis descriptivo o cualitativo

b.1) Evaluación histológica:

b.1.1) Subcutáneo

De las ratas sacrificadas la semana 0, 1, 2, 4, 8 y 16 fueron removidos, tanto los implantes multilaminares, como el control positivo, incluyendo el tejido circundante. Las muestras fueron fijadas en una solución de formalina al 10% y procesadas para técnica histológica de rutina. Se hicieron cortes de 4 μ m que luego fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) y Mallory Heidenhain (Lee *et al*, 2000). Las muestras fueron analizadas al microscopio óptico, para evaluar la respuesta tisular. Determinamos: posibles alteraciones inflamatorias (presencia de edema, alteraciones vasculares e infiltración inflamatoria); proceso reparativo (fibrosis y proliferación de fibroblastos); neoformación ósea o cartilaginosa; vascularización. Para esto, se digitalizaron las imágenes correspondientes en aumentos 40x, 100x, 200x, y 400x con una resolución de 512 x 480 pixeles, mediante una videocámara digital montada en un microscopio óptico científico.

b.1.2) Tibiales

Los conejos de cada grupo fueron sacrificados a las 0, 1, 2, 4, 8 y 16 semanas. Las tibias implantadas y no implantadas de cada grupo, fueron procesadas para el estudio histológico. Para esto, fueron fijadas en formalina al 10%, por una semana para su posterior lavado por dos días. Luego descalcificadas en Anna Morse (ácido fórmico 10% y citrato de sodio 5% en proporción 1:1) por 7 días (Morse, 1945) y lavadas durante cuatro días, para luego ser procesadas por técnica histológica de rutina. Finalmente se realizaron cortes de 4 μ m que fueron teñidos con H-E y Mallory-Heidenhain (Lee *et al*, 2000).

Se determino según los objetivos planteados, la biocompatibilidad mediante: formación de hueso (osteoinducción), neovascularización (osteoconducción), inflamación (inmunotolerancia). Además se evaluó si los extremos de la lesión forman puentes óseos con el implante (osteointegración). La regeneración ósea y la biodegradación fueron evidenciados a través del estudio histológico.

b. 2) Evaluación radiológica

Se tomaron radiografías del segmento tibial izquierdo y derecho de cada conejo, las semanas 1, 2, 4, 8 y 16 post implante (posterior a la eutanasia), para determinar presencia o ausencia de defecto (lesión), profundidad de la lesión, reacción periosteal y endostal esclerosis periférica, continuidad de corticales externas y evaluación de tejidos blandos. Además, se tomaron radiografías al tiempo cero de la cirugía con y sin implante. Las radiografías fueron observadas en negatoscopio, evaluadas y luego fotografiadas con una cámara digital.

VIII. RESULTADOS

Resultados Histológicos

Todos los animales cumplieron el tiempo de seguimiento previsto. No se observaron efectos locales de irritación tisular, supuración o drenaje desde el lugar de implantación, ni se produjeron fracturas durante todo el seguimiento postoperatorio de los animales.

A) Prueba de implantes multilaminares *in vivo* en subcutáneo de ratas

Al implantar el cubo del compuesto en el subcutáneo de rata, se observó en tiempo cero la malla reticular del implante y dentro de ella distintos tamaños de poros y sangre hemolizada (figura 1a).

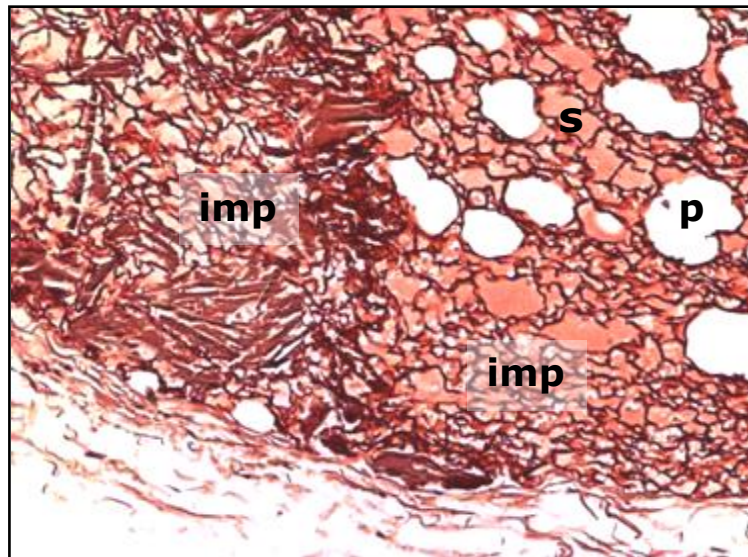


Figura 1a. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con compuesto multilaminar en tiempo 0. Malla reticular de quitosano (imp) y dentro de ella sangre hemolizada (s). Se observa la porosidad de distintos tamaños del implante (p). H-E, 100x.

En el mismo tiempo en el control (+) de matriz de hueso, se observó como la matriz mantuvo su estructura conservada con presencia de osteocitos en las lagunas óseas (figura 1b).

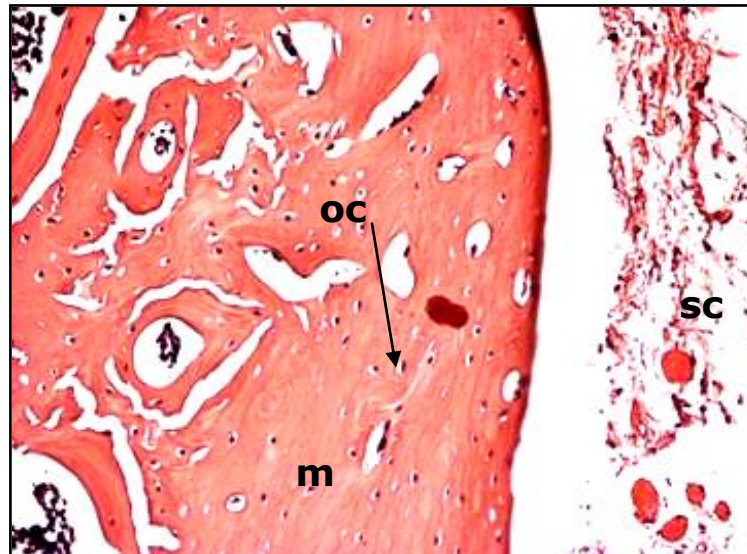


Figura 1b. Corte histológico de tejido subcutáneo (sc) de rata con matriz de hueso (m) en tiempo 0. Estructura ósea conservada con presencia de osteocitos en lagunas óseas (oc). H-E, 100x.

A la primera semana de implantado el compuesto, se presentó una reacción inflamatoria aguda con predominio de neutrófilos y macrófagos, más en la periferia que en el centro del implante (figura 2a). Se evidencia la formación de capilares sanguíneos (figura 2b). Por su parte, el implante se encontró encapsulado por fibras colágenas con proliferación de fibroblastos, proveniente del subcutáneo (figura 2c).

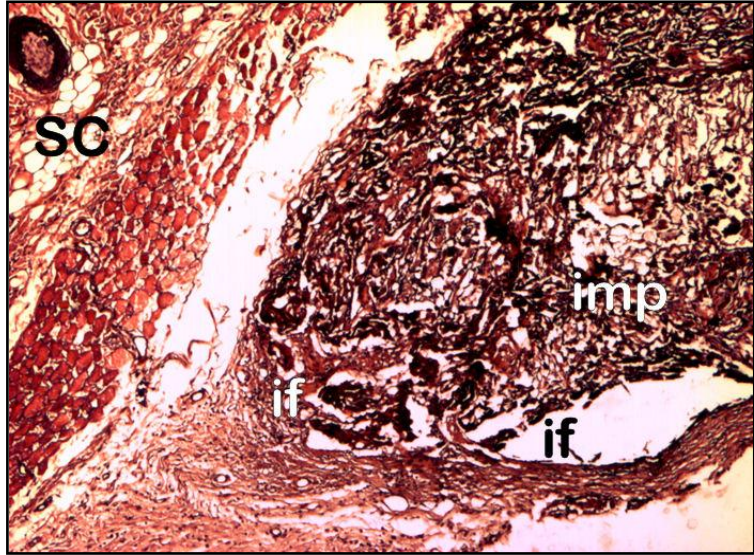


Figura 2a. Corte histológico de subcutáneo (sc) de rata con implante (imp), la 1ª semana post quirúrgica. Se observa la reacción inflamatoria aguda (if) alrededor del implante. H-E, 40x

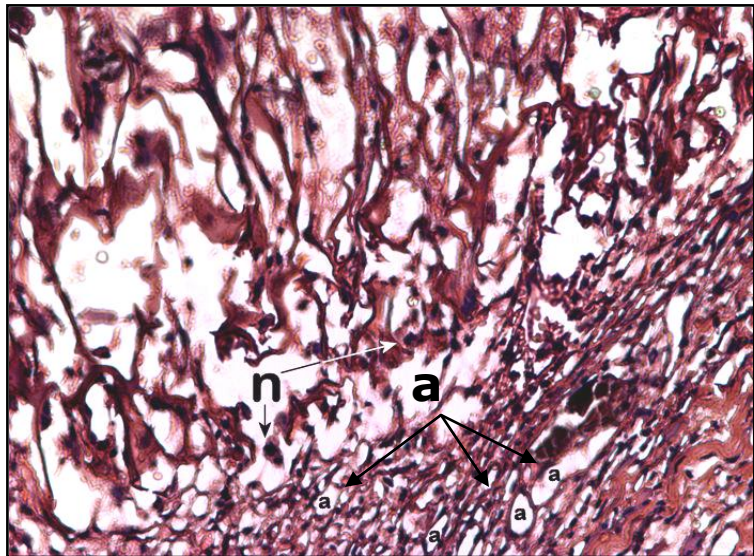


Figura 2b. A mayor aumento se observan neutrófilos (n) invadiendo el implante y neovascularización (a). H-E, 200x.

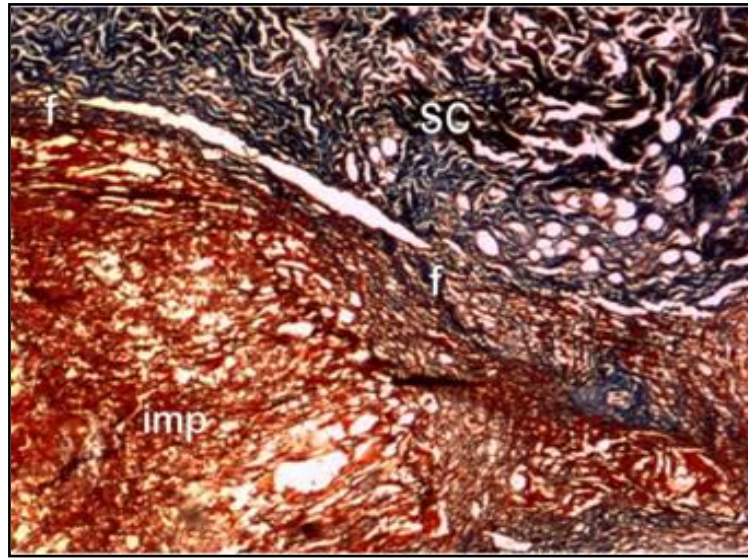


Figura 2c. Corte histológico de subcutáneo (sc) de rata con implante (imp), 1ª semana postoperatorio. Fibras de colágeno (f) provenientes del subcutáneo rodean todo el implante (imp). Mallory, 100x.

Por otra parte, el cubo de matriz de hueso desmineralizado, presentó una cápsula gruesa alrededor, muy definida de tejido fibroblástico, sin invasión hacia su interior (figura 3). Dentro de la matriz, los osteocitos que quedaron luego de la descalcificación se desintegraron. Hay focos de macrófagos y una leve inflamación alrededor de la matriz de hueso.

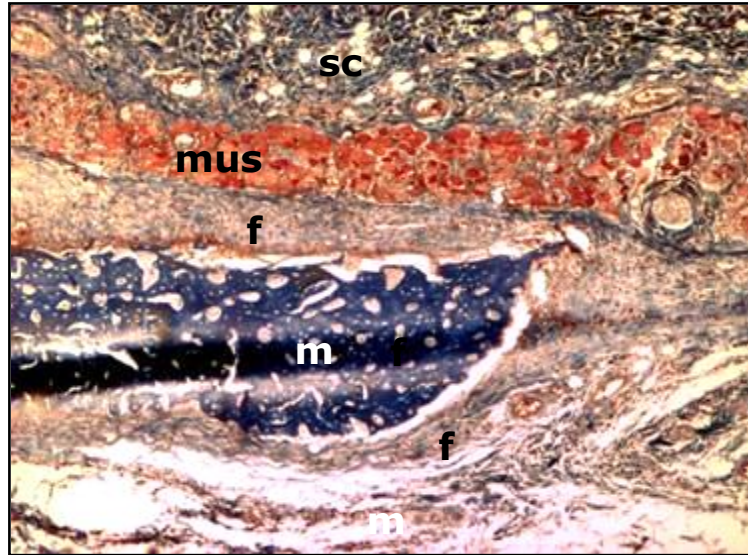


Figura 3. Corte histológico de subcutáneo de ratas con control (+) en la 1ª semana post quirúrgica. Se observan las distintas capas histológicas. Matriz de hueso (m), cápsula de tejido fibroblástico a su alrededor (f) músculo (mus) y subcutáneo (sc). Mallory, 40x.

En la segunda semana posterior a la implantación del cubo del compuesto, continúa la inflamación con un menor infiltrado de células inflamatorias. El implante sigue rodeado de tejido conectivo colagenoso, el cual comienza a invadir el implante con sus fibras y células fibroblásticas. Esto nos indica que el subcutáneo ha comenzado a integrar el implante (figuras 4a y b). Entre la malla reticular del implante se encuentran neutrófilos, macrófagos, linfocitos, eritrocitos, fibras colágenas y detritus celulares.

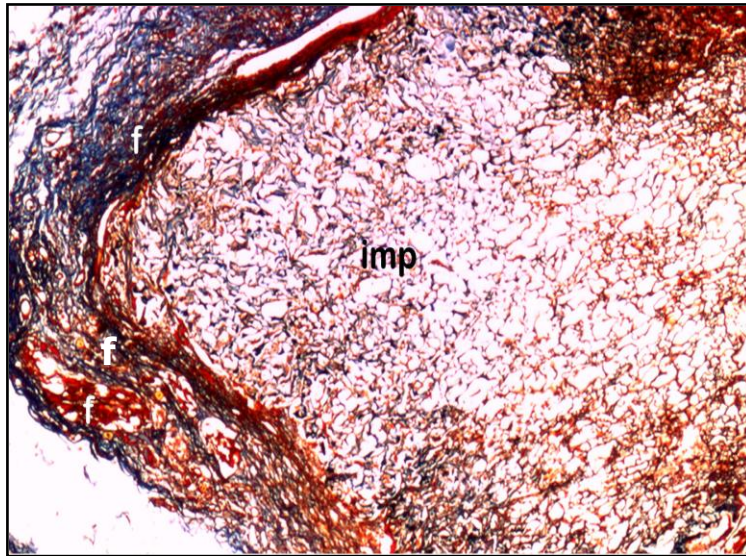


Figura 4a. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante a la 2ª semana post quirúrgica. Cápsula de fibras colágenas (f) alrededor del implante (imp). Mallory, 40x.

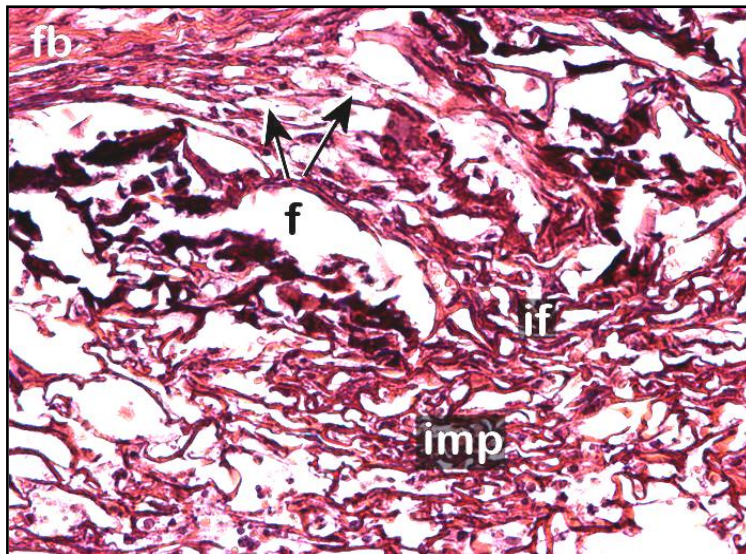


Figura 4b. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (imp). Infiltrado de células inflamatorias (if) entre la malla reticular de quitosano. Se observa como las fibras colágenas (f) con células fibroblásticas (fb) entran hacia el implante. H-E, 200x.

Por su parte, en el control (+) durante la 2ª semana post cirugía, desaparece el leve proceso inflamatorio observado en la 1ª semana. Continúan las fibras colágenas con células fibroblásticas y capilares sanguíneos alrededor de la matriz de hueso interactuando desde la periferia (figura 5a). Se observa un foco de formación de cartílago con presencia de condroblastos activos y osteoblastos secretando matriz osteoide. Hay formación de trabéculas óseas (figura 5b).

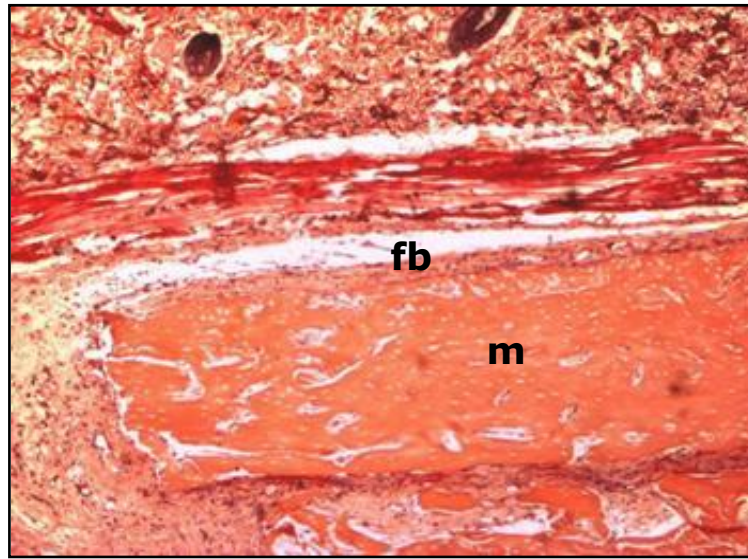


Figura 5a. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con matriz de hueso (m) en la 2ª semana post quirúrgica. Tejido fibroblástico rodea la matriz (fb). H-E, 40x.

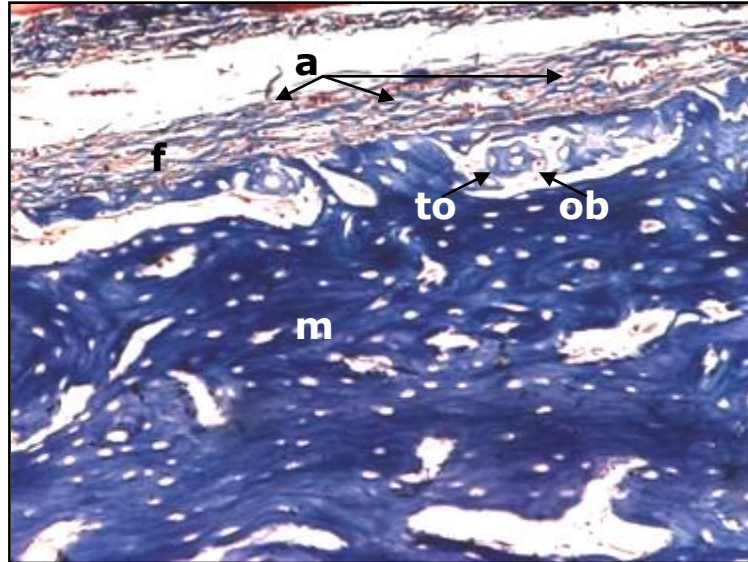


Figura 5b. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con matriz de hueso (m). Trabéculas óseas en formación (to), con osteoblastos (ob) secretando matriz osteoide, fibras colágenas (f) con células fibroblásticas y neovascularización (a). Mallory, 200x.

Ya alcanzada la cuarta semana post implante, el proceso inflamatorio instaurado en el implante y sus alrededores continua de forma leve. Hay predominio de linfocitos y macrófagos. El tejido subcutáneo a envuelto el implante y a través de sus fibras colágenas, y células infiltradas traen la neovascularización de la zona hacia el interior del implante. El implante de quitosano ha disminuído su tamaño a medida que se ha ido biodegradando y que el subcutáneo ha penetrado dividiendo en partes el implante (figuras 6 a, b y c).

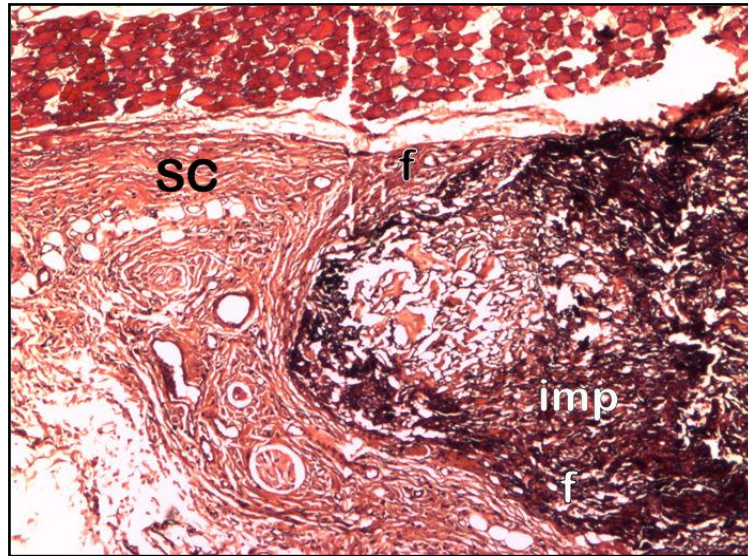


Figura 6a. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (imp) en la 4ª semana post quirúrgica. El tejido subcutáneo (sc) rodea todo el implante y sus fibras colágenas (f) se introducen hacia el centro. Se evidencia la disminución de tamaño del implante debido a su biodegradación. H-E, 40x.

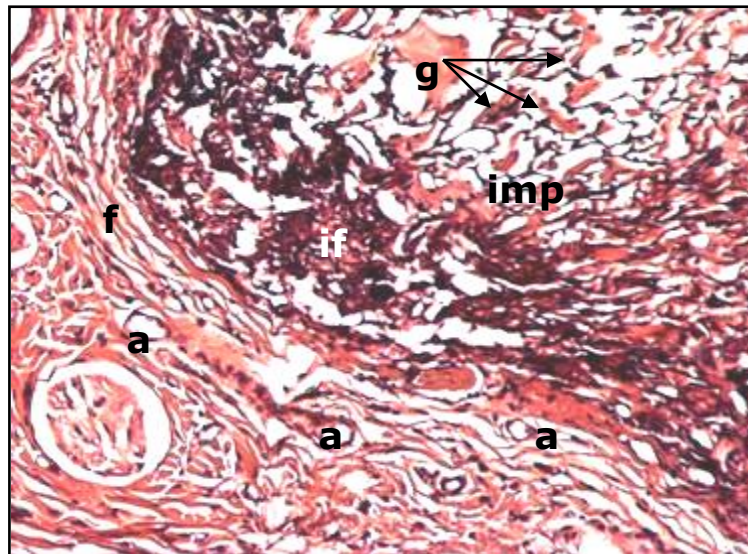


Figura 6b. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante. Infiltrado de células inflamatorias (if), macrófagos (g), fibras colágenas (f) restos del implante (imp) y neovascularización (a). H-E, 100x.

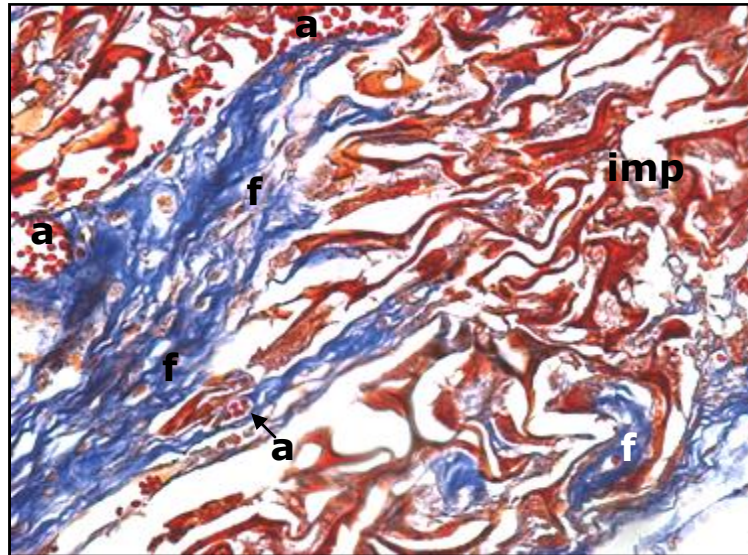


Figura 6c. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante. Fibras colágenas (f), células y capilares sanguíneos (a) provenientes del subcutáneo penetran entre la malla del implante. Mallory, 200x.

Por otra parte en la matriz de hueso de rata, sigue avanzando el proceso de regeneración de hueso en fase proliferativa, visto en la 2ª semana post quirúrgica. Fue repoblada de osteoblastos que se encuentran secretando matriz osteoide, para formar las trabéculas óseas, ya no sólo en la periferia sino en toda la matriz implantada. Hay focos de matriz mineralizada que se observan en la tinción de H-E de un color café oscuro y angiogénesis al interior de la matriz y fuera de ella (figura 7 a y b). Alrededor del hueso se formó un nuevo periostio el cual nutre al hueso (figura 8).

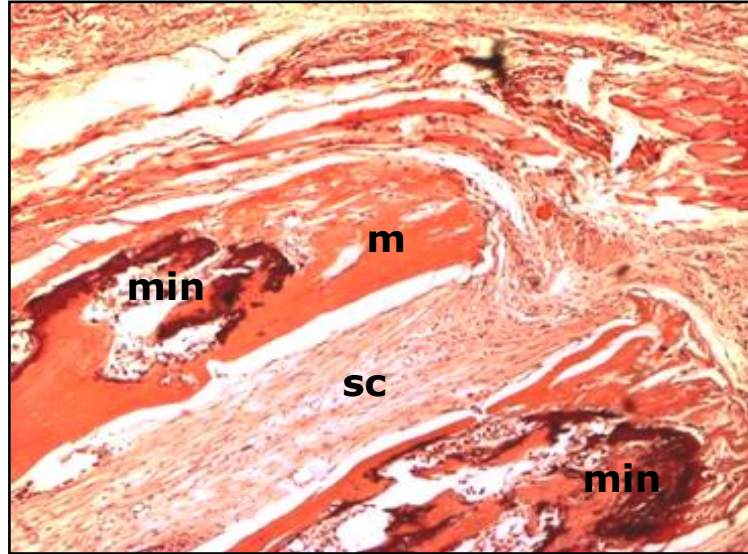


Figura 7a. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata (sc), con matriz de hueso (m) en la 4ª semana post quirúrgica. Focos de mineralización (min). H-E, 40x.

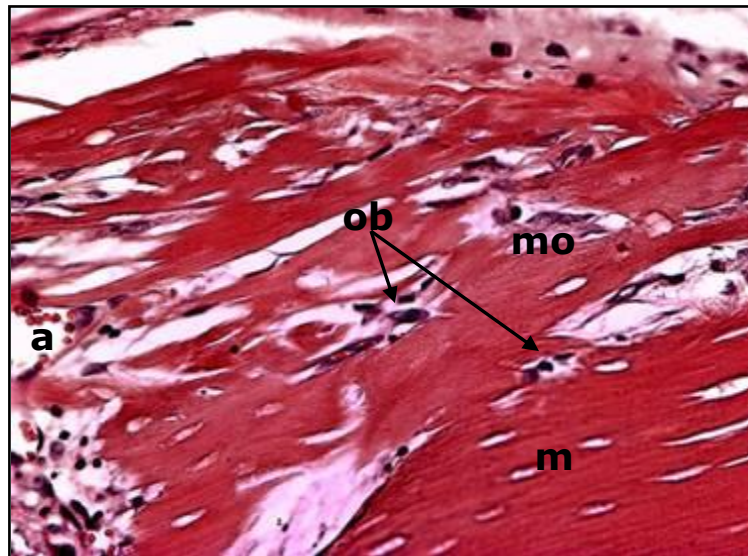


Figura 7b. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con matriz de hueso (m). Activa osteogénesis. Osteoblastos (ob) secretando matriz osteoide (mo) y angiogénesis (a). H-E, 200x.

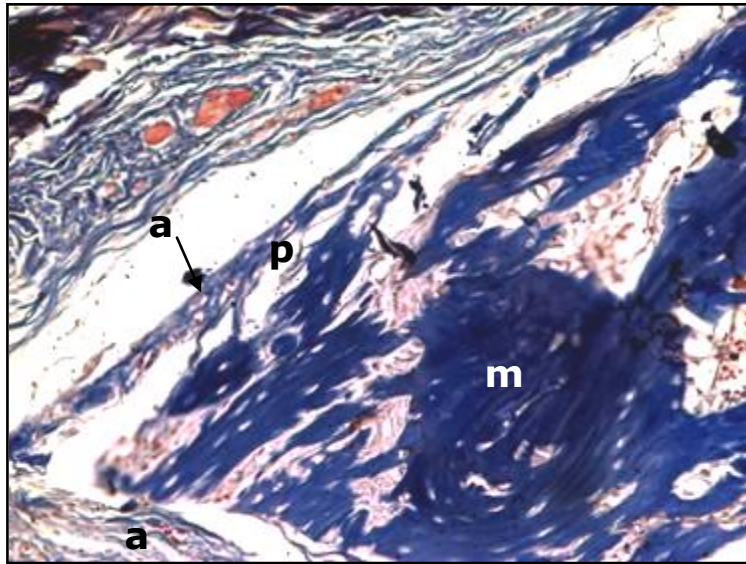


Figura 8. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con matriz de hueso (m). Se observa como el periostio (p) nutre a la matriz de hueso con células y gran cantidad de capilares sanguíneos (a). Mallory, 100x.

En la octava semana post implante, se encontró una disminución del tamaño del biocompósito y la pérdida de su arquitectura, lo cual es esperado debido a que en la 4ª semana el proceso de biodegradación ya se había iniciado. En esta semana sólo quedan restos del implante, ya que las fibras colágenas desde el subcutáneo siguieron envolviendo el implante y penetraron en todas las direcciones desde la periferia. Todavía mantiene una fina cápsula de fibras colágenas que lo envuelve. Hay gran cantidad de capilares sanguíneos, formando redes en todo el implante (figura 9a). Además se mantiene la inflamación leve presente desde la 1ª semana post implante. Entre las células, se pudieron distinguir linfocitos y macrófagos (figura 9b). Los macrófagos se concentran alrededor de los restos de implante.

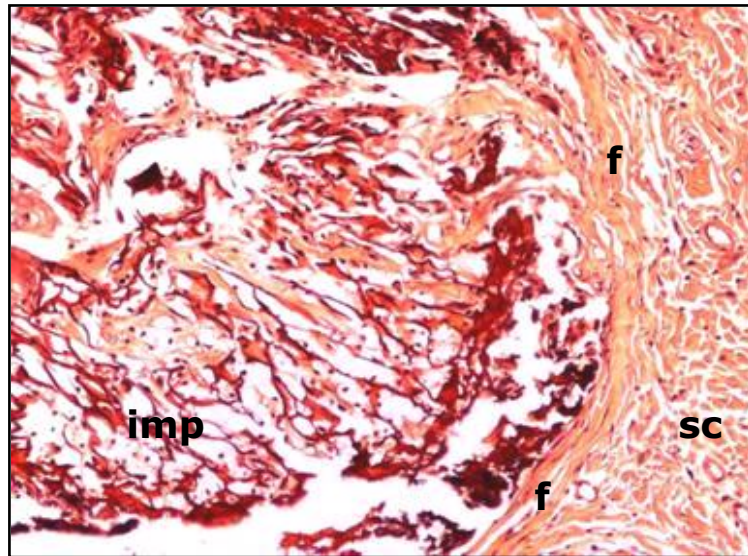


Figura 9a. Corte histológico de tejido subcutáneo (sc) de rata con restos del implante (imp) a la 8ª semana post quirúrgica. Fina cápsula de fibras colágenas alrededor del implante (f), se observa como se introducen a través del implante. H-E, 40x.

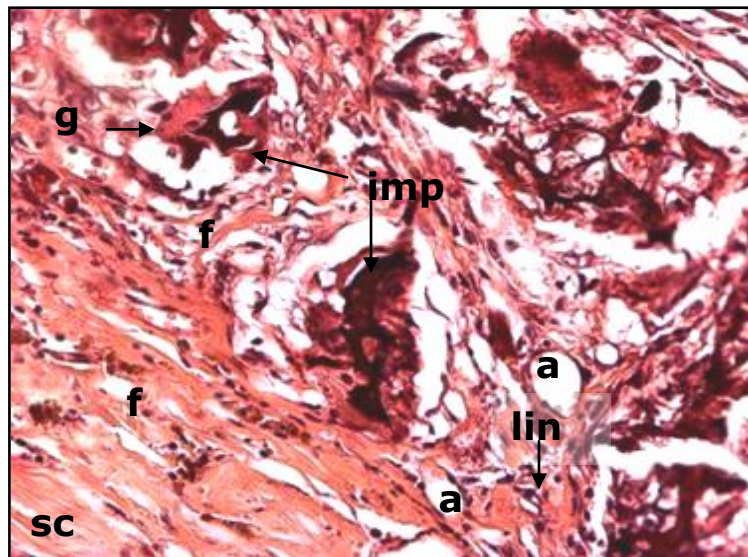


Figura 9b. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con implante (imp). Se observan redes vasculares (a) entre la fibras colágenas (f), linfocitos (lin) y macrófagos (g) alrededor de los restos del compuesto. H-E, 200x.

En el control (+) se observó gran parte de la matriz de hueso de rata mineralizada (figura 10b). Hay una menor actividad osteoblástica y una mayor actividad osteogénica. Se distinguen osteocitos atrapados en las lagunas óseas. Siguiendo el transcurso normal en la regeneración de hueso, se está formando una cavidad medular más bien adiposa que mielógena, esto se debe a que los estímulos necesarios para la atracción de células mielógenas hacia el subcutáneo es insuficiente (figura 10a). Dentro de las lagunas adiposas hay angiogénesis.

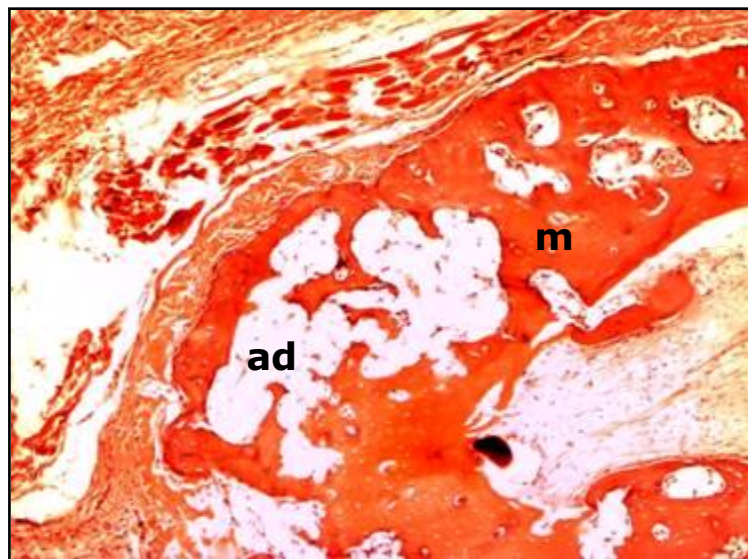


Figura 10a. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con matriz de hueso (m) a la 8ª semana post quirúrgica. Se observan cavidades dentro de la matriz de hueso con gran cantidad de adipositos (ad). H-E, 40x.

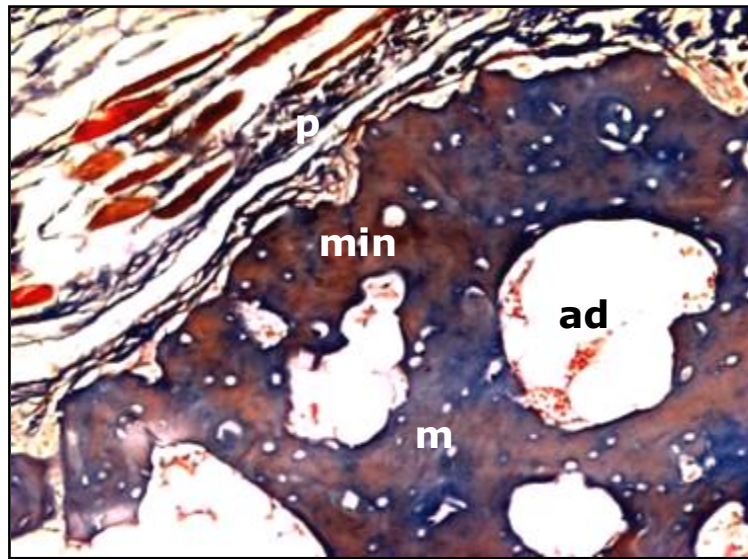


Figura 10b. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con matriz de hueso (m) en proceso de mineralización (min). Se observa claramente el periostio (p) y cavidades con adipositos (ad). Mallory, 100x.

En la décimo sexta semana de experimentación, el compuesto a disminuído de tamaño considerablemente, debido a la biodegradación, quedando solo restos de la malla desorganizados, mezclado con fibras colágenas, capilares sanguíneos formando redes, macrófagos tratando de fagocitar lo que queda del implante y detritus celulares (figura 11b). El lugar donde estaba el implante fue ocupado por el tejido subcutáneo, con sus fibras colágenas, en la medida que el implante se fue degradando (figura 11a).

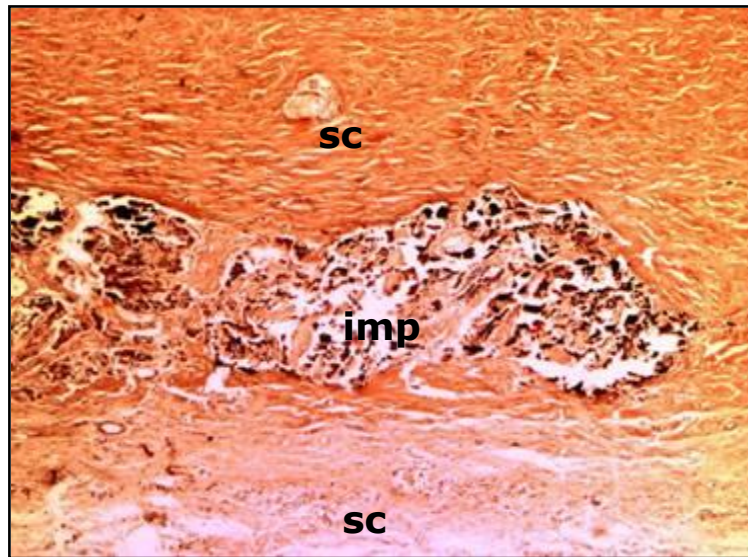


Figura 11a. Corte histológico de tejido subcutáneo (sc) de rata con restos del implante (imp). Se observa como el tejido subcutáneo ha rellenado el espacio que ocupaba el implante a medida que éste se fue degradando. H-E, 40x.

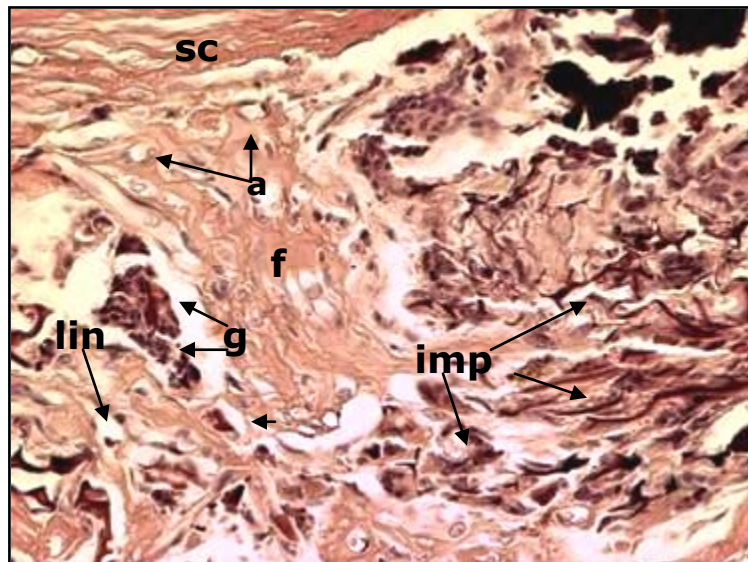


Figura 11b. Corte histológico de tejido subcutáneo (sc) de rata con restos del implante (imp) a las 16 semanas post quirúrgica. Se observan macrófagos (g), fibras colágenas (f), linfocitos (lin) y neovascularización (a) H-E, 200x.

En esta semana, en el control (+) queda claro como la matriz de hueso de rata desmineralizada fue utilizada para formar nuevamente un hueso trabecular mineralizado, con periostio a su alrededor y cavidad medular adiposa. El nuevo hueso fue integrado al tejido circundante (figura 12a y b)

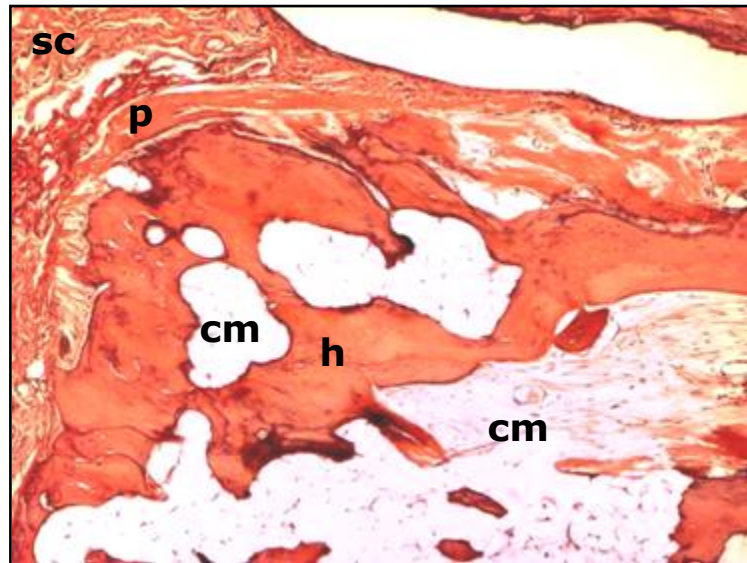


Figura 12a. Corte histológico de tejido subcutáneo (sc) de rata con hueso trabecular (h), periostio (p) y cavidad medular (cm). H-E, 100x.

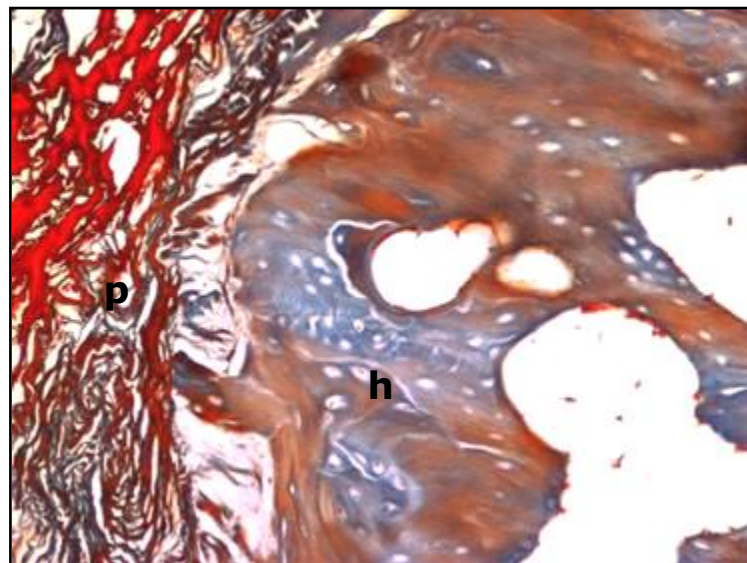


Figura 12b. Corte histológico de tejido subcutáneo de rata con hueso mineralizado. Se ve la íntima relación entre el periostio (p) y el hueso (h). El nuevo hueso se encuentra integrado al tejido circundante. Mallory, 100x.

B) **Prueba de implantes multilaminares *in vivo* en tibias de conejo:**

Al implantar el biocompósito multilaminar en la lesión de 4mm en la cresta tibial del conejo, en el tiempo 0 post implante, se observó claramente el sitio de lesión como la discontinuidad de las corticales de la tibia. A mayor aumento en el interior del implante se observó gran cantidad de eritrocitos con cambios morfológicos que indican degeneración. También hay presencia de neutrófilos y linfocitos en menor cantidad (figura 13 a y b).

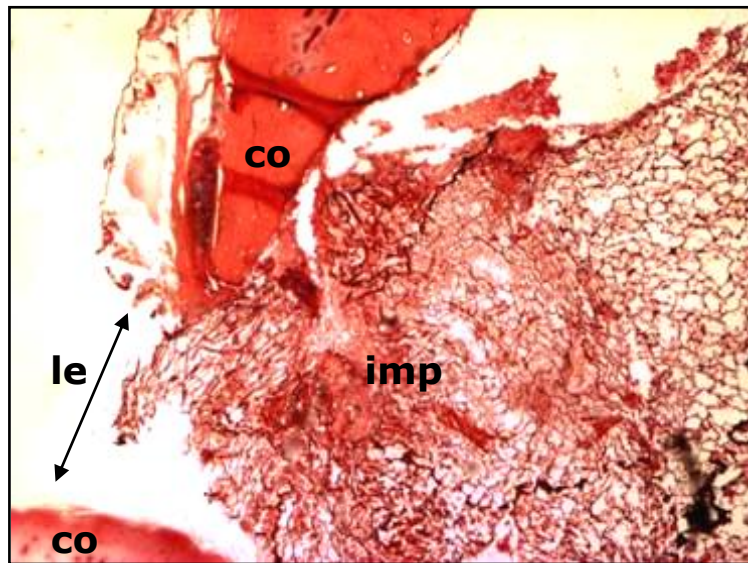


Figura 13a. Corte histológico longitudinal de tibia de conejo en tiempo 0. Se observa la discontinuidad de las corticales (co) y el implante multilaminar (imp) en la lesión (le) de 4mm. H-E, 40x.

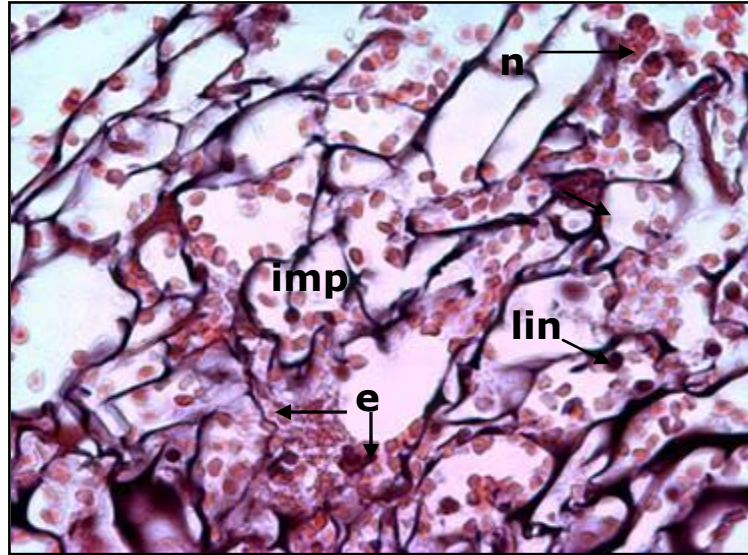


Figura 13b. Corte histológico longitudinal de tibia de conejo con implante en tiempo 0. Reticulado del implante (imp). Gran cantidad de eritrocitos (e) con cambios morfológicos que indican degeneración. Además se observan neutrófilos (n) y linfocitos (lin) en menor cantidad. H-E, 400x

Por otra parte, en el control, al igual que en el implante se observó el sitio de lesión como la discontinuidad de las corticales y entre estas pequeños fragmentos de hueso y tejido mieloide proveniente de la médula del hueso (figura 14).

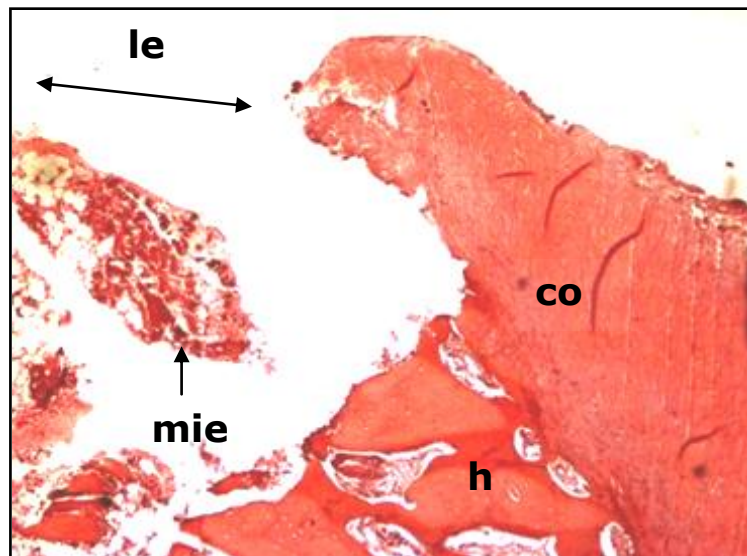


Figura 14. Corte histológico longitudinal de tibia de conejo sin implante (control) en tiempo 0. Se observa claramente el sitio de la lesión como la discontinuidad de las corticales diafisarias (co). Hay presencia de tejido mieloide (mie) y fragmentos de hueso (h). H-E, 40x.

Al implantar el biocompósito multilaminar en la lesión de 4mm en la cresta tibial del conejo, en la primera semana post implante, se observó una clara reacción inflamatoria alrededor del implante generando una zona intermedia densa, compuesta principalmente por células inflamatorias leucocíticas de tipo polimorfonucleares y menor cantidad de linfocitos (figura 15a). En algunos sectores, donde se concentra la mayor reacción inflamatoria se observó precipitación de calcio, que podría deberse a una calcificación distrófica de la zona (figura 15b). En el interior del implante hay menor cantidad de células en comparación a la periferia del implante. Además se observa la migración del periostio hacia el implante con presencia de células osteoprogenitoras. Hay proliferación de endotelios que todavía no se han conectado entre ellos.

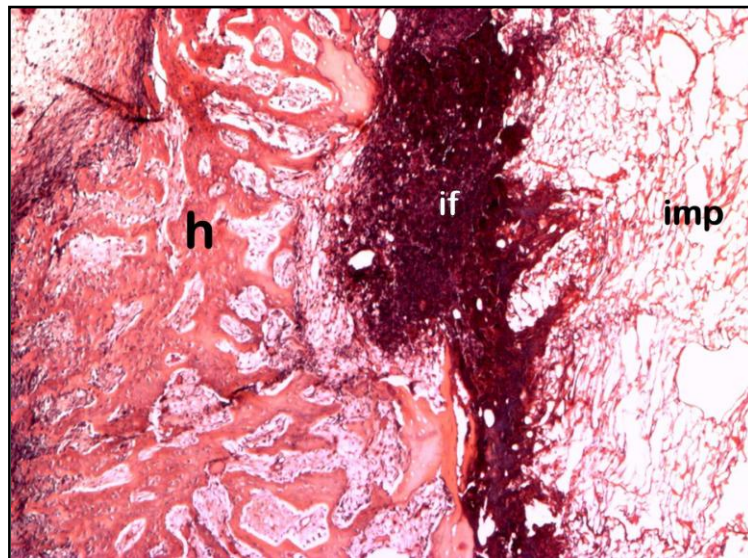


Figura 15a. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con compósito multilaminar en la 1ª semana post quirúrgica. Se observa una clara reacción inflamatoria (if) en la zona de transición entre el hueso (h) circundante y el implante. H-E, 40x

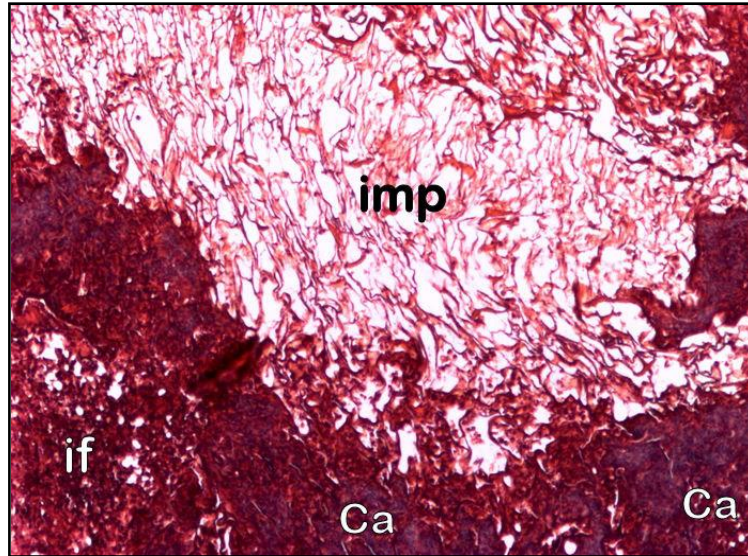


Figura 15b. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante (imp) 1ª semana post quirúrgica. Foco de precipitación de calcio (ca) entre las células inflamatorias (if). H-E, 100x.

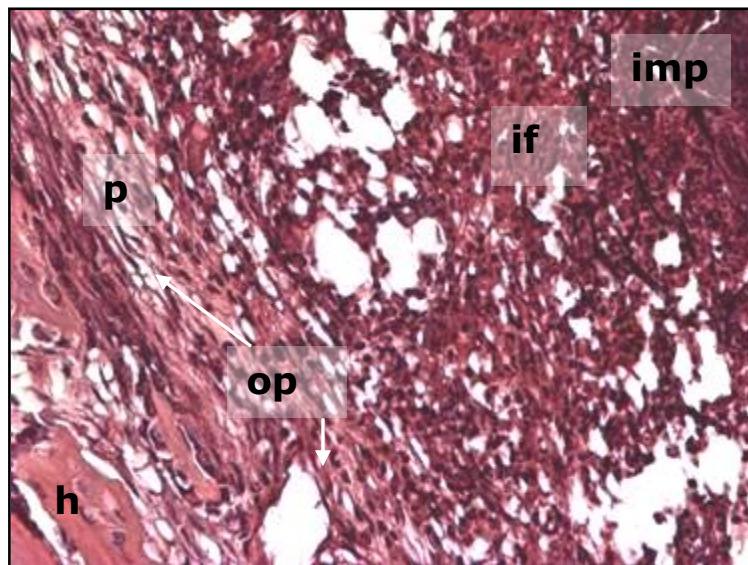


Figura 15c. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante 1ª semana post quirúrgica. Zona de transición entre el implante (imp) y el hueso (h) circundante. Se observan gran cantidad de células inflamatorias (if) y células osteoprogenitoras (op) provenientes del periostio (p). H-E, 200x.

Por otra parte, en el control, al cual solo se le realizó la lesión de 4mm, se observó gran cantidad de células inflamatorias entre las corticales de la cresta tibial (figura 16a). Además, desde el periostio han migrado células osteoprogenitoras rellenoando el espacio producido por la lesión (figura 16b). Se evidenció fuerte actividad osteoblástica osteogénica desde el periostio produciéndose osificación tanto directa o membranosa a través de la formación de trabéculas óseas, como indirecta a través de la formación de tejido cartilaginoso que se encuentra en fase proliferativa (figura 16c). Además se visualizaron fenómenos vasculares como angiogénesis.

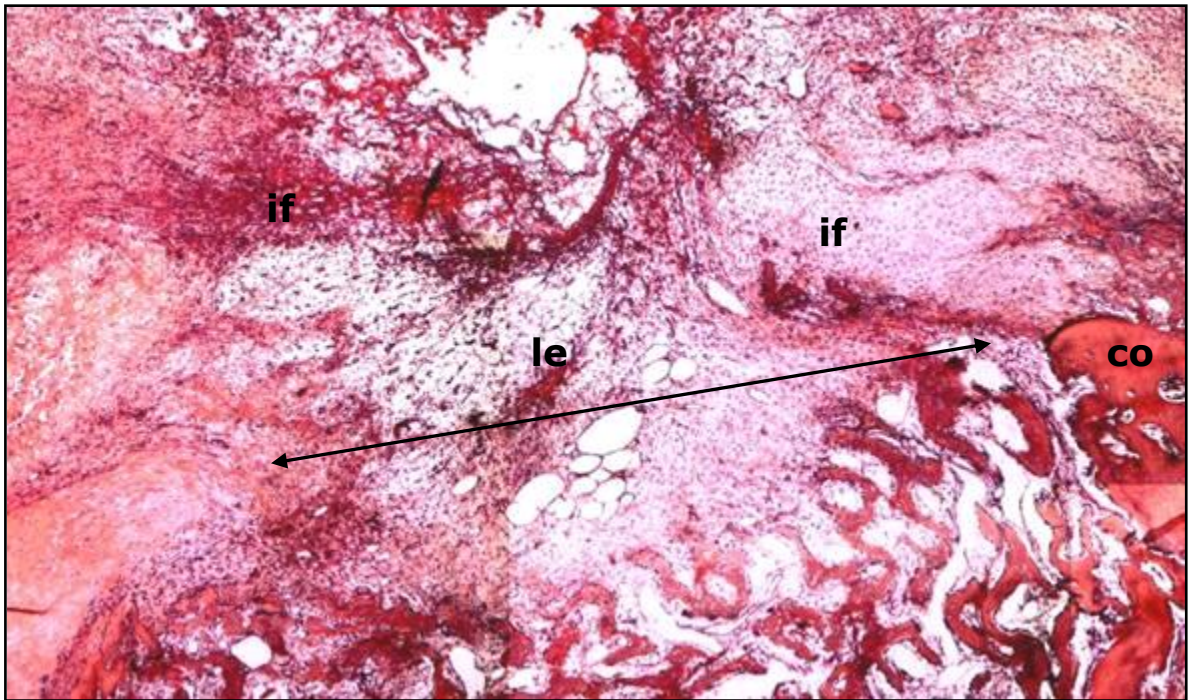


Figura 16a. Vista panorámica de cortes histológicos longitudinales de cresta tibial de conejo sin implante en la 1ª semana post quirúrgica. Se ve la discontinuidad de las corticales (co). Hay una reacción inflamatoria (if) normal en el sitio de la lesión (le) de 4mm. H-E, 40x.

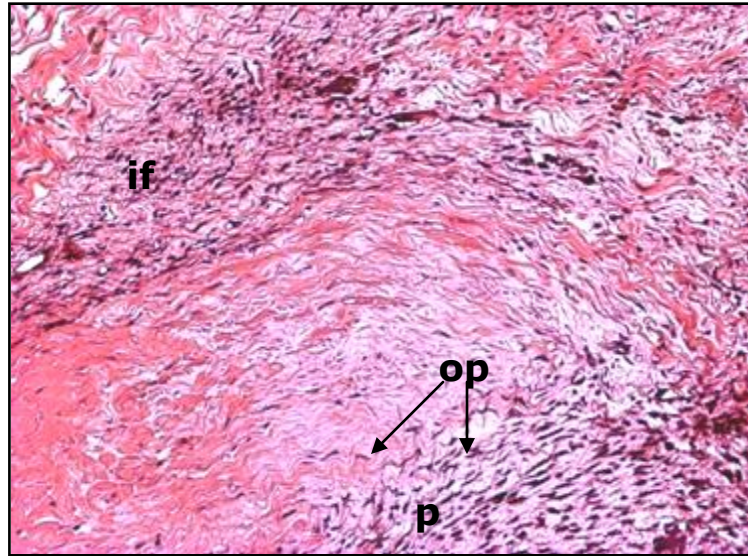


Figura 16b. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo sin implante en 1ª semana post quirúrgica. Se observa la migración del periostio (p) hacia la lesión con células osteoprogenitoras (op). Hay gran cantidad de células inflamatorias (if). H-E 100x.

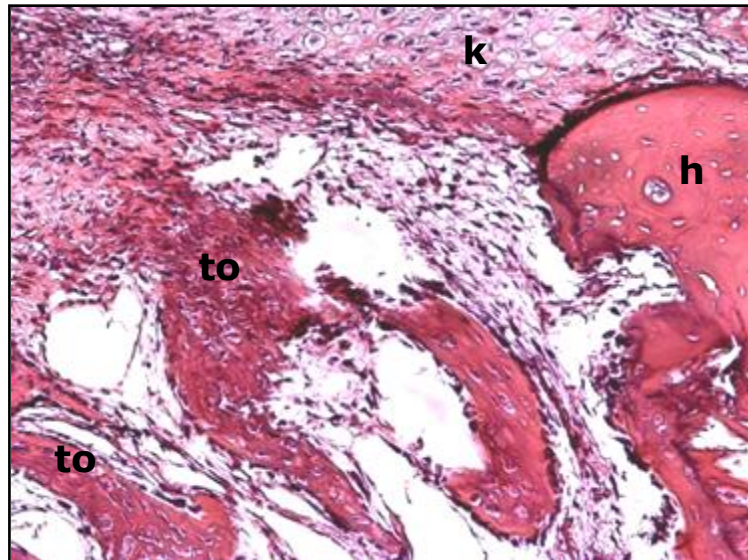


Figura 16c. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo sin implante en la 1ª semana post quirúrgica. Trabéculas óseas (to) en formación y tejido cartilaginosa en fase proliferativa (k). H-E, 100x.

En la segunda semana posterior a la implantación del biocompósito multilaminar continúa la intensa reacción inflamatoria que abarca tanto la periferia como el interior del implante (figura 17a). Se distinguen células leucocitarias principalmente polimorfonucleares. En la periferia se observó como ha avanzado el proceso inflamatorio obteniendo la degradación de la zona y la precipitación de calcio en distintas áreas. Se generó una zona de transición entre el implante y el tejido fibroblástico dispuesta de forma laminar con presencia de gran cantidad de células osteoprogenitoras (figura 17c). Sobre el implante en la parte mas cercana al periostio se observó como este ha rodeado al implante y ha penetrado con células osteoprogenitoras, osteoblastos y gran cantidad de capilares sanguíneos (figura 17b). El implante esta interactuando con hueso a su alrededor (figura 17d).

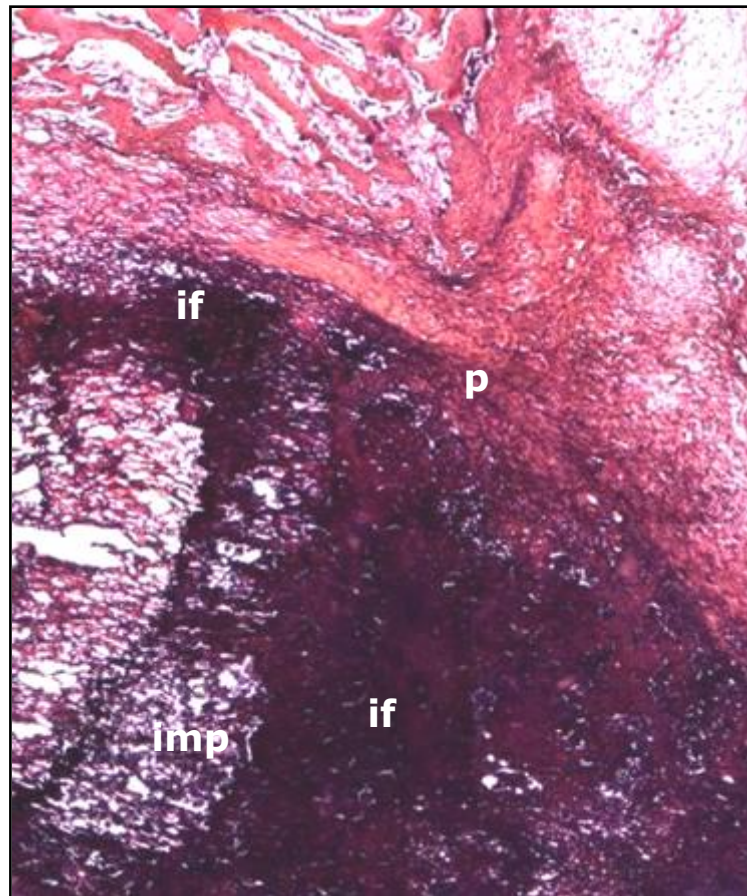


Figura 17a. Corte longitudinal de cresta tibial de conejo con implante (imp) 2ª semana post quirúrgica. Se evidencia la intensa reacción inflamatoria (if) que abarca todo el implante y el periostio (p) que rodea el implante. H-E, 40x.

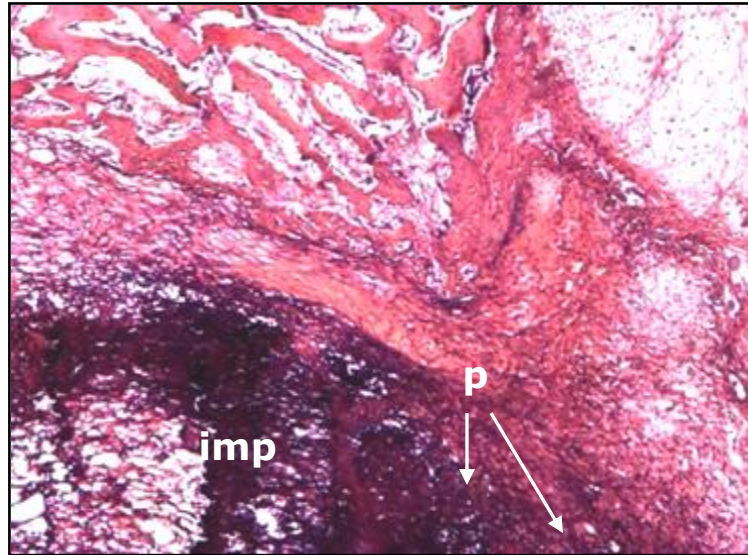


Figura 17b. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante (imp) en la 2ª semana post quirúrgica. Se observa como el periostio (p) se integra en la periferia del implante. H-E, 100x.

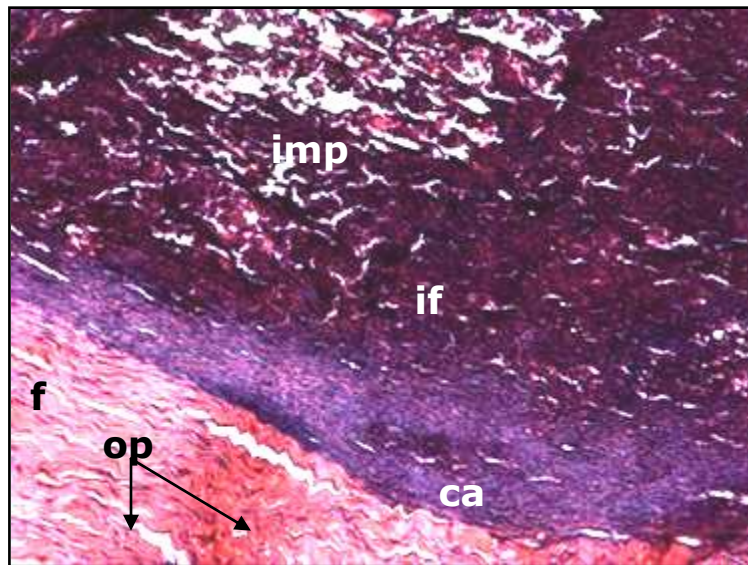


Figura 17c. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante 2ª semana post quirúrgica. En la zona de transición entre el implante (imp) y el tejido fibroblástico (f) hay depósito de calcio (ca). Se evidencia la presencia de gran cantidad de células osteoprogenitoras (op) y de células inflamatorias (if). H-E, 100x.

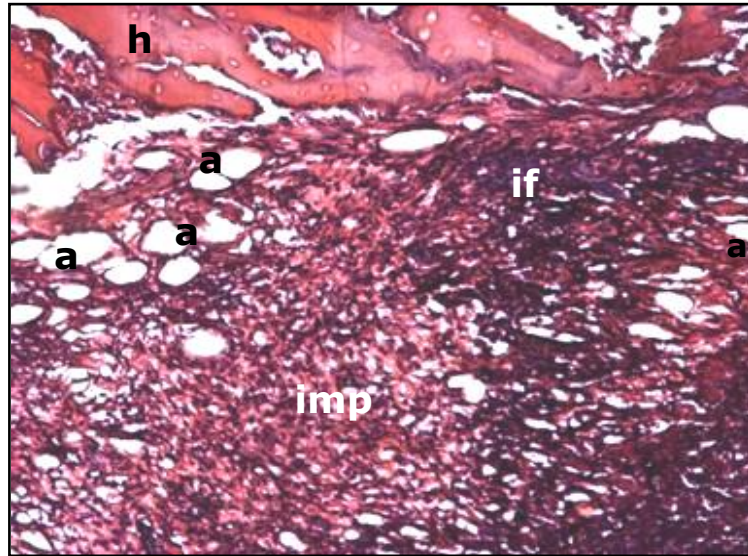


Figura 17d. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante en la 2ª semana post quirúrgica. Se observa como el implante (imp) esta interactuando con el hueso (h) circundante. Hay neovascularización (a) y células inflamatorias (if) dentro del implante. H-E, 100x.

En esta misma semana, en el control se observó la interacción e integración de la zona intervenida con el periostio y hueso cortical. Continúa el proceso de osificación directa e indirecta a través de formación de trabéculas óseas y cartílago en fase proliferativa. Además hay gran cantidad de células osteoprogenitoras provenientes del periostio que avanzan cubriendo el defecto con abundante vascularización (figuras 18a y b).

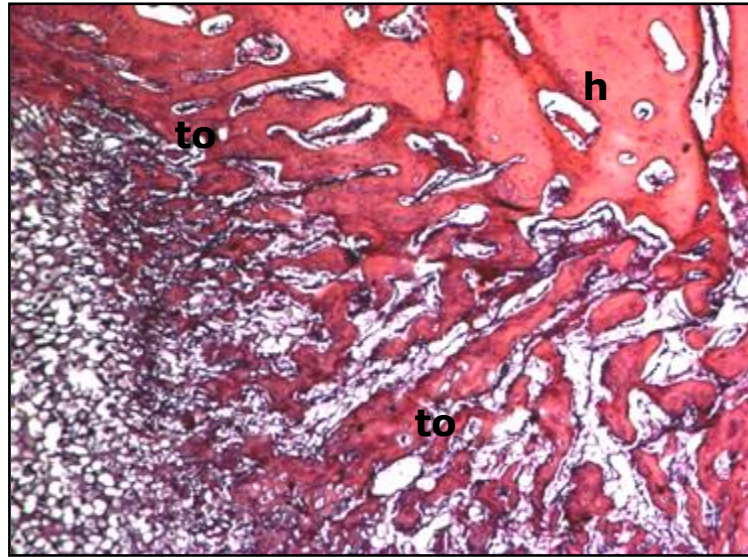


Figura 18a. Corte histológico longitudinal de cresta tibial sin implante en proceso de reparación a la 2^o semana post quirúrgica. Se evidencia la formación de trabéculas óseas (to) en la zona intervenida. H-E, 100x.

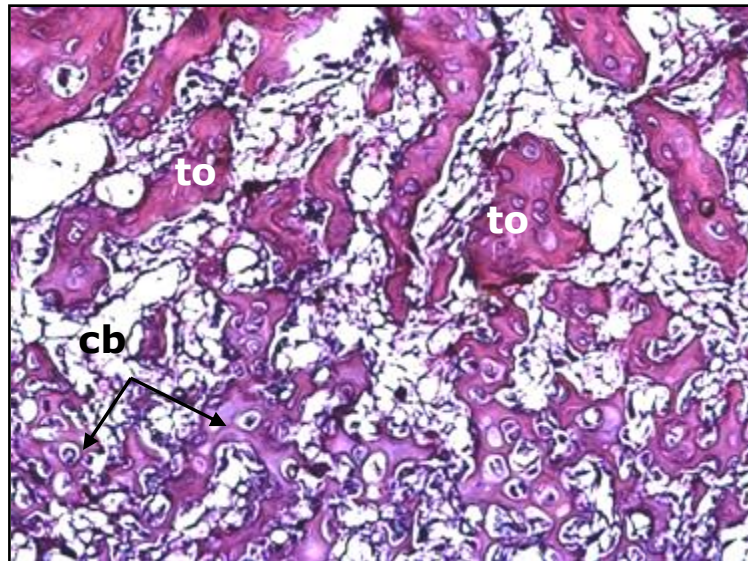


Figura 18b. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo sin implante con mayor aumento. La formación de trabéculas óseas (to) es a través de osificación indirecta por condroblastos (cb). H-E, 200x.

A la cuarta semana post implante, se encontró una disminución del tamaño del implante y su degradación a través de una fuerte actividad osteoclástica en la periferia de éste. La periferia del implante esta integrada con el hueso cortical y continúa el avance del periostio a través del implante (figura 19a). Los osteoclastos presentes son gigantes y se concentran en focos alrededor de la malla de quitosano. Existe una zona de transición entre la periferia del implante y la cortical del hueso donde ha comenzado la síntesis de matriz osteoide (figura 19b). En el centro continua el proceso inflamatorio, ya en su etapa final, con la consecuente degradación de la zona.

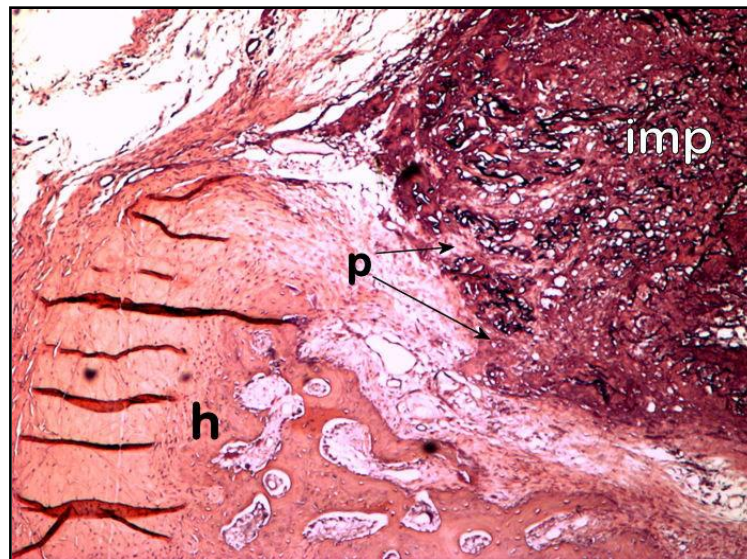


Figura 19a. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante en la 4ª semana post quirúrgica. Se observa la integración con el hueso y como el periostio (p) ingresa al implante (imp). H-E, 100x.

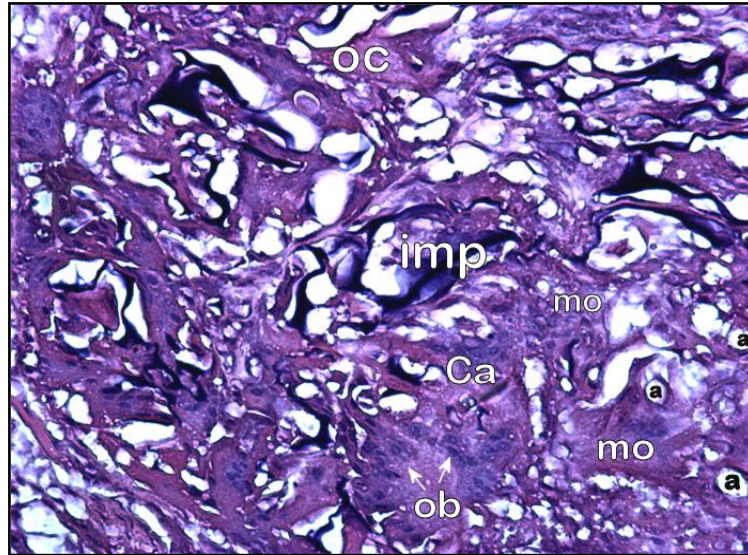


Figura 19b. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante (imp) 4ª semana post quirúrgica. Formación de matriz osteoide (mo) por osteoblastos (ob). Presencia de osteoclastos gigantes (oc), precipitación de calcio (ca) y neovascularización (a). H-E, 200x.

En el control fue posible observar la unión de las corticales de la cresta tibial. Las trabéculas óseas formadas se encuentran en proceso de organización. Entre ellas se observó angiogénesis y tejido mieloide (figura 20).

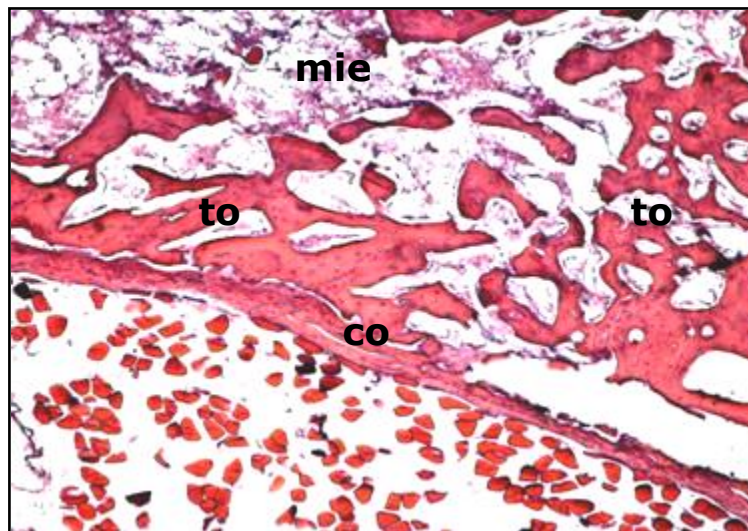


Figura 20. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo sin implante en 4ª semana post quirúrgicas. Las corticales (co) se han unido y las trabéculas óseas (to) se están organizando. Entre ellas se observa tejido mieloide (mie). H-E. 40x.

Entrada la octava semana luego de la implantación del biocompósito multilaminar en la lesión de 4 mm de la cresta tibial, sigue ocurriendo el mismo proceso instaurado desde la segunda semana. El periostio sigue su recorrido a través del implante con células osteoblásticas y pequeños vasos sanguíneos. Los osteoblastos se encuentran sintetizando matriz osteoide en la periferia del implante. Continúa el proceso de degradación por osteoclastos gigantes de la malla reticular del implante, la cual se encuentra más disgregada. En esta etapa el implante se integró al tejido circundante y comenzó a formar neohueso (figura 21 a y b).

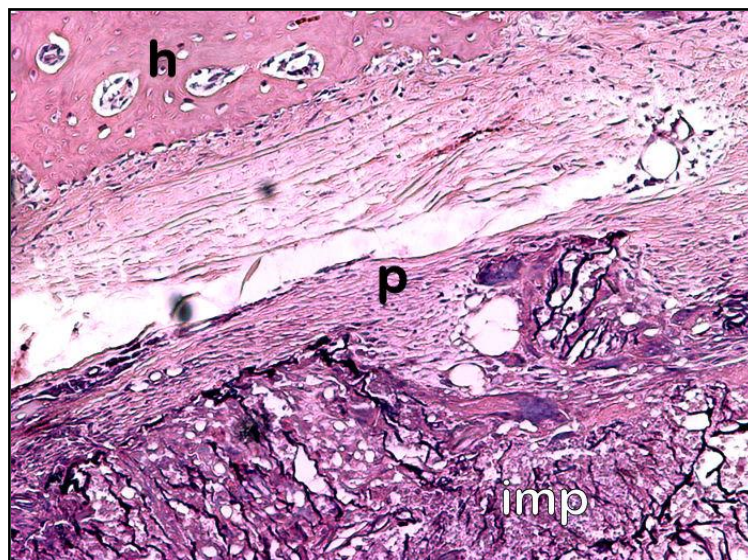


Figura 21a. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante en la 8ª semana post quirúrgica. Se observa la malla reticulada del implante (imp) disgregada y hueso del huésped (h). Hay gran actividad osteoblástica proveniente del periostio (p). H-E, 100x.

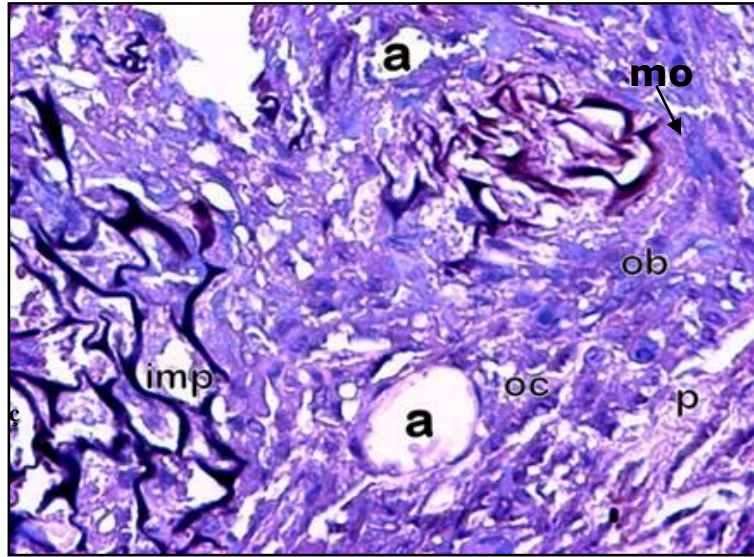


Figura 21b. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante (imp). Ha comenzado la síntesis de matriz osteoide (mo) por osteoblastos (ob) provenientes del periostio (p), neovascularización (a) y la biodegradación de la malla reticular por osteoclastos (oc). H-E, 400x

En esta misma etapa, en la tibia sin implante se evidenciaron trabéculas óseas en formación, laminillas óseas estructuradas y cavidad medular. Continúa el proceso de regeneración ósea, en fase de reparación, instaurado desde la 1ª semana del estudio. Hay síntesis de matriz con actividad osteoblástica y osteoclástica (figura 22).

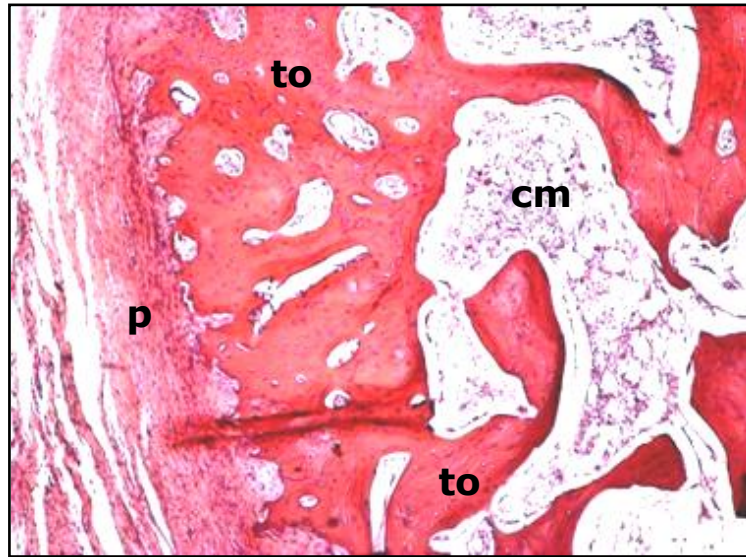


Figura 22. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo sin implante a la 8ª semana post quirúrgica. El hueso se encuentra en fase de reparación. Se observa el periostio (p), trabéculas óseas (to) y cavidad medular (cm). H-E, 40x.

En la última semana de estudio, vale decir, en la décimo sexta semana post cirugía, no se observan restos del implante multilaminar, ya que se logró la plena integración del implante con el hueso, quedando solo un pequeño indicio del implante por la presencia de osteoblastos, osteoclastos en la profundidad del sitio donde se realizó la lesión, rodeado de hueso inmaduro, que con el tiempo deberá ser remodelado (figura 23a y b).



Figura 23a. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo con implante en la 16 semana post quirúrgica. Se observa en la zona que ocupaba el implante hueso inmaduro (hi), osteoblastos (ob) y neovascularización (a) y a su alrededor hueso compacto laminar. H-E, 100x.

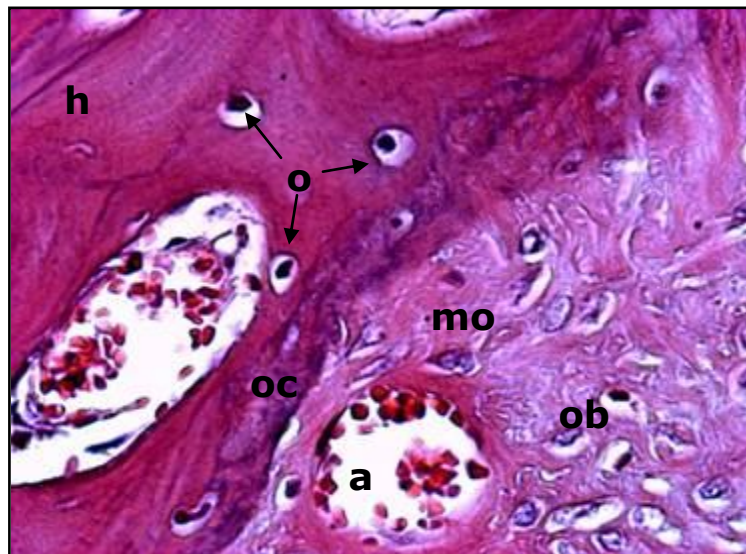


Figura 23b. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo a las 16 semanas post quirúrgica. Se observa la transición entre hueso compacto laminar mineralizado (h) y la síntesis de matriz osteoide (mo). Hay osteocitos (o), osteoblastos (ob), osteoclastos (oc) y neovascularización (a). H-E, 400x.

Por su parte, en el control en esta semana se observó un pequeño defecto longitudinal en el sitio de intervención. Se observa hueso inmaduro, actividad osteoblástica y osteoclástica. Por lo tanto, continúa la regeneración en fase de remodelación en el sitio de la lesión.

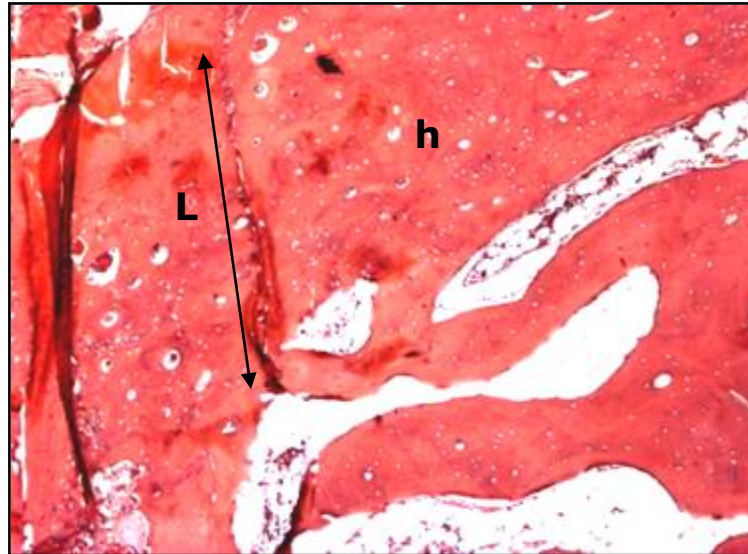


Figura 24a. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo sin implante a las 16 semanas post quirúrgica. Se observa un defecto longitudinal (L) que recorre el hueso (h). H-E, 40x.

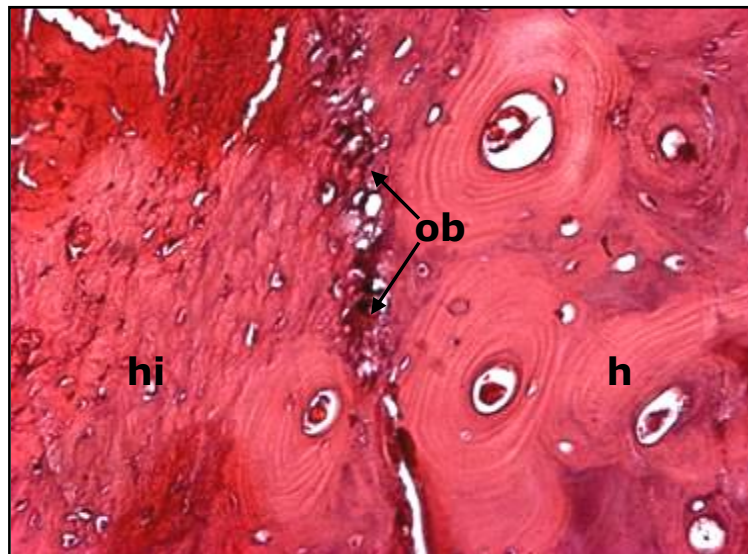


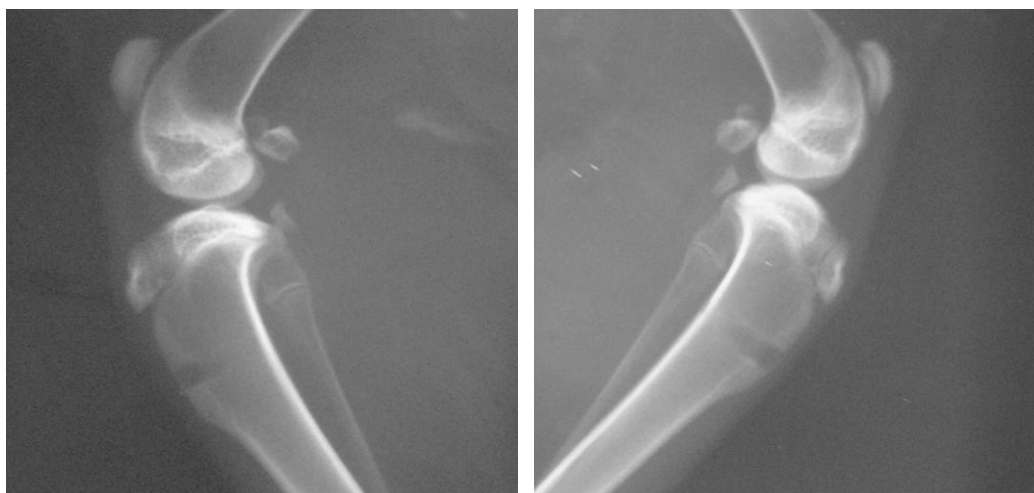
Figura 24b. Corte histológico longitudinal de cresta tibial de conejo sin implante. Se observa la transición entre hueso compacto laminar mineralizado (h) y el hueso inmaduro (hi). Entre los distintos huesos hay osteoblastos (ob). H-E, 200x.

b. Resultados de la Evaluación Radiográfica de Tibia de Conejos

Las radiografías del segmento tibia- peroné de ambos miembros posteriores de cada conejo fueron evaluadas tomando en consideración los siguientes parámetros: presencia o ausencia del defecto (lesión), reacción tanto periosteal como endostal, esclerosis periférica, unión de corticales, tejidos blandos y profundidad de la lesión, la cual se estableció en base a los contornos originales de la misma lesión en el mismo conejo, no en base a la lesión de la semana 0, ya que cada lesión no es perfectamente igual en cada conejo. El porcentaje es subjetivo y en base a 100% de la lesión original.

La radiografía que representó el tiempo cero del estudio, fue tomada luego de concluida la cirugía. El segmento tibia-peroné para implantar el biocompuesto multilaminar, fue establecido en tibia derecha implante y tibia izquierda control.

CONEJO SEMANA N° 0			
Control		Implante	
Defecto (lesión)	Presente	Defecto (lesión)	Presente
Profundidad de la lesión	100%	Profundidad de la lesión	100%
Reacción periosteal	No	Reacción periosteal	No
Reacción endostal	No	Reacción endostal	No
Esclerosis periférica	No	Esclerosis periférica	No
Unión Cortical	No	Unión Cortical	No
Tejidos blandos	Normal	Tejidos blandos	Normal



El miembro experimental fue observado y evaluado en el negatoscopio. En el tiempo 0 se observó claramente la lesión realizada con el trocar de 4 mm, como una discontinuidad de las corticales y un sector radiolúcido. La profundidad de la línea de fractura fue de 100% y se encontraba muy definida, no había reacción periosteal, endostal ni tampoco esclerosis periférica. No se observó unión de corticales y los tejidos blandos estaban normales.

Por otra parte, en el miembro control, el cual no fue implantado, presentó las mismas características anteriormente señaladas.

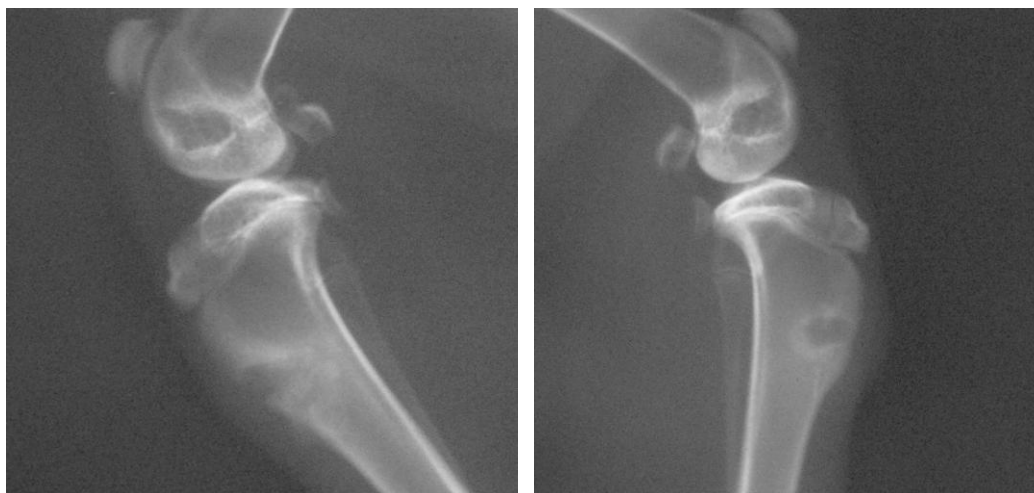
CONEJO SEMANA N° 1			
Control		Implante	
Defecto (lesión)	Presente	Defecto (lesión)	Presente
Profundidad de la lesión	75%	Profundidad de la lesión	100%
Reacción periosteal	Abundante	Reacción periosteal	Escasa
Reacción endostal	Moderada	Reacción endostal	Escasa
Esclerosis periférica	Moderada	Esclerosis periférica	Moderada
Unión Cortical	Si	Unión Cortical	No
Tejidos blandos	Aumento moderado	Tejidos blandos	Normal



A la primera semana post implante, en la tibia implantada, se mantuvo el 100% de profundidad de la lesión, hay una escasa reacción periosteal, endostal y moderada esclerosis periférica. No se han unido las corticales y los tejidos blandos se encuentran normales. En la otra tibia del conejo, no implantada, el tejido periosteal reaccionó en forma abundante, el endostal moderadamente al igual que la esclerosis periférica y los tejidos blandos. Se

observó tempranamente unión de corticales y disminución de la profundidad de la lesión en un 25%.

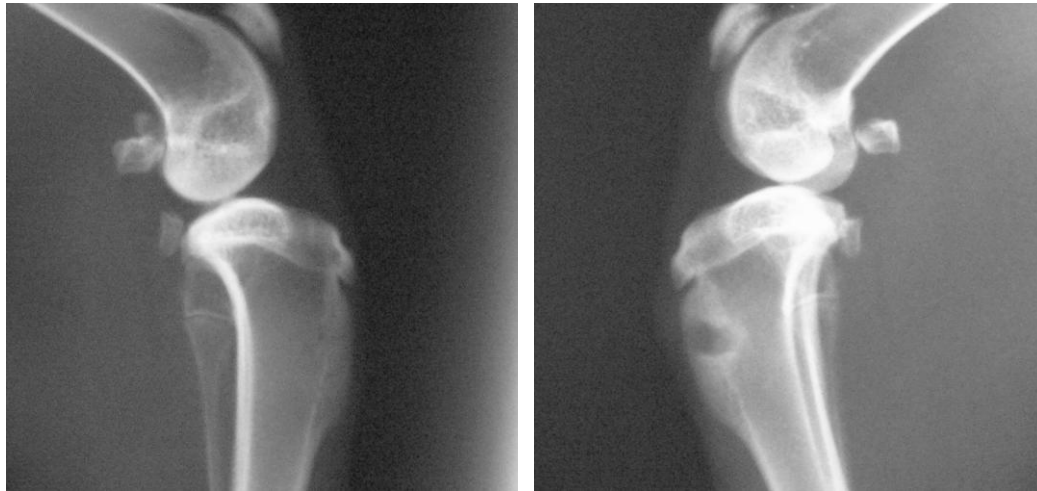
CONEJO SEMANA N° 2			
Control		Implante	
Defecto (lesión)	Presente	Defecto (lesión)	Presente
Profundidad de la lesión	50%	Profundidad de la lesión	80%
Reacción periosteal	Escasa	Reacción periosteal	Moderada
Reacción endostal	Abundante	Reacción endostal	Moderada
Esclerosis periférica	Abundante	Esclerosis periférica	Moderada
Unión Cortical	No	Unión Cortical	Si
Tejidos blandos	Aumento Leve	Tejidos blandos	Aumento Leve



La segunda semana posterior a la implantación del biocompósito multilaminar, se observó la disminución de la profundidad de la lesión quedando en un 80%. Se encontró un nivel de reacción periosteal, endostal y esclerosis periférica moderada y con un ligero aumento de los tejidos blandos. Hubo unión de corticales.

Por su parte, en la radiografía control se advirtió la no unión de las corticales a diferencia del tiempo anterior donde si hubo. La profundidad de la lesión sigue disminuyendo quedando en un 50%. La reacción periosteal disminuyó en relación a la 1ª semana, pero no así la reacción endostal y esclerosis periférica que fueron abundantes. Los tejidos blandos se observaron levemente aumentados.

CONEJO SEMANA N° 4			
Control		Implante	
Defecto (lesión)	Presente	Defecto (lesión)	Presente
Profundidad de la lesión	0%	Profundidad de la lesión	50%
Reacción periosteal	Remodelada	Reacción periosteal	Abundante
Reacción endostal	Remodelada	Reacción endostal	Escasa
Esclerosis periférica	Ausente	Esclerosis periférica	Moderada
Unión Cortical	Si	Unión Cortical	Si
Tejidos blandos	Normal	Tejidos blandos	Normal



Luego de cuatro semanas de implantado el biocompuesto multilaminar se evidenció que el defecto producto de la lesión sigue presente. Se produjo un cambio de profundidad de lesión de 80% a 50%. La reacción periosteal fue abundante, la endostal escasa y la esclerosis periférica moderada. Los tejidos blandos volvieron a su normalidad y hubo unión de corticales.

En la radiografía del miembro control se observó todo normal. La profundidad de lesión es 0%, hay presencia de la lesión, no hay ningún tipo de reacción, los tejidos blandos están normales y hay unión de corticales.

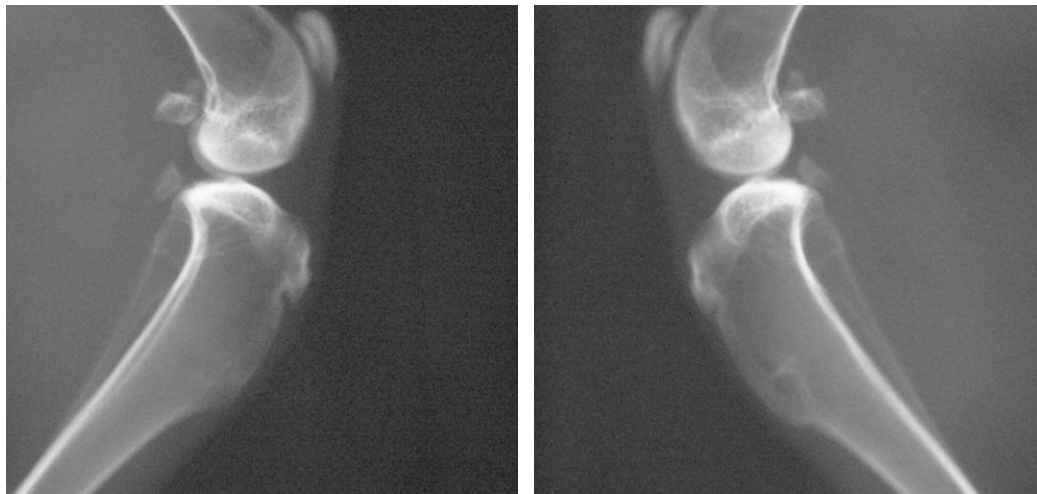
CONEJO SEMANA N° 8			
Control		Implante	
Defecto (lesión)	Presente	Defecto (lesión)	Presente
Profundidad de la lesión	10%	Profundidad de la lesión	25%
Reacción periosteal	Abundante	Reacción periosteal	Abundante
Reacción endostal	Moderada	Reacción endostal	Moderada
Esclerosis periférica	Escasa	Esclerosis periférica	Moderada
Unión Cortical	Si	Unión Cortical	Si
Tejidos blandos	Normal	Tejidos blandos	Normal



Entrada la octava semana después de la implantación del biocompuesto multilaminar, continúa el proceso de reparación óseo establecido en la lesión, el único cambio importante con respecto a las 4 semanas es la profundidad de lesión que disminuyó a 25%.

En esta misma semana, la otra tibia del conejo sin implante, comparado con la radiografía de las 4 semanas no tuvieron relación, ya que en este tiempo, el proceso parecía haber terminado, lo cual no fue así, ya que a las 8 semanas, todavía esta presente la lesión con una profundidad de 10%, reacción periosteal abundante, reacción endostal moderada y esclerosis periférica escasa. Hay unión de corticales y los tejidos blandos están normales.

CONEJO SEMANA N° 16			
Control		Implante	
Defecto (lesión)	Ausente	Defecto (lesión)	Presente
Profundidad de la lesión	0%	Profundidad de la lesión	50%
Reacción periosteal	Remodelada	Reacción periosteal	Abundante
Reacción endostal	Remodelada	Reacción endostal	Escasa
Esclerosis periférica	Ausente	Esclerosis periférica	Escasa
Unión Cortical	Si	Unión Cortical	Si
Tejidos blandos	Normal	Tejidos blandos	Normal



En la última semana de estudio la tibia con implante mostró una profundidad de lesión de 50%, el mismo porcentaje obtenido a las 2 semanas por el control sin implante. Se mantiene la reacción periosteal abundante y la reacción endostal fue escasa al igual que la esclerosis periférica. Los tejidos blandos siguen normales y las corticales unidas.

Por su parte, en el control la lesión esta ausente y todos los parámetros evaluados se encuentran normales. El proceso de reparación ha terminado ya que se encuentra cerrada la lesión y las reacciones periosteal e endostal remodeladas.

IX. DISCUSIÓN

Para la evaluación biológica de biomateriales como dispositivos médicos, según el protocolo experimental dispuesto por la norma ISO 10993, fue necesario evaluar en primera instancia, el biocompósito multilaminar, en el subcutáneo de ratas. El objetivo de este estudio fue evaluar histológicamente la respuesta tisular a la presencia del biocompósito a diferentes tiempos de implantación y compararlos con resultados de otros autores que implantaron matrices porosas de quitosano en subcutáneo de ratas (Vandervord *et al*, 2001) y HAP + quitina intramuscularmente en ratas (Ge *et al*, 2004).

Los resultados del estudio histológico de tejido subcutáneo de ratas, muestran que desde la 1ª semana se generó una reacción inflamatoria, que se mantuvo durante las 16 semanas de estudio. La respuesta inflamatoria no fue siempre igual, sólo en la 1ª semana esta respuesta fue aguda, con gran cantidad de neutrófilos y macrófagos, pero ya en la 2ª semana la cantidad de células inflamatorias disminuyó considerablemente, y en la medida que el tiempo avanzaba la inflamación fue cediendo, con predominio de linfocitos y macrófagos. En la última semana de estudio, vale decir, a las 16 semana sólo quedan restos del implante y al interior tejido subcutáneo con escasa presencia de células como fibroblastos, macrófagos, células gigantes y una leve respuesta inflamatoria. Esto demuestra que el compósito es inmunotolerado por el tejido receptor, ya que la respuesta inflamatoria producida no fue exagerada ni tampoco acompañada de los signos típicos de la inflamación como edema y eritema.

Otro hallazgo importante fue que desde la 1ª semana de estudio el implante fue encapsulado por una capa de fibras colágenas provenientes del subcutáneo. En la 2ª semana fue evidente la invasión hacia el implante, por parte del tejido subcutáneo que ya no sólo encapsulaba el implante sino que penetró desde la periferia con sus fibras colágenas, células fibroblásticas y neovascularización. Este proceso se mantuvo y durante la 4ª y 8ª semana se aprecia la fuerte invasión del tejido circundante a tal grado que las fibras colágenas ocupan parte del implante. La capa fibrosa que rodeaba al implante se mantuvo durante las dos primeras semanas luego fue disminuyendo y con el tiempo sólo estaba presente una fina capa de fibras alrededor del implante. Esto permite decir que no hubo reacción a cuerpo extraño, en la cual el objeto es encapsulado por varias capas de tejido fibroso. En cambio,

la capa que envolvía el implante lo invadió, introduciéndose desde la periferia y disponiéndose entre la malla porosa del implante. Este hecho habla a favor de su capacidad conductiva, inductiva e integrativa con el tejido circundante.

Con respecto a la degradación del implante esta comenzó desde la 1ª semana de estudio, ya que durante esta semana abundantes macrófagos invadieron el implante. Los macrófagos estuvieron presentes en todos los tiempos estudiados y presentaron características de células gigantes con gran cantidad de núcleos y fueron los encargados de degradar la malla reticular del implante. Entre la 4ª y 8ª semana se encontró la máxima actividad fagocitaria con macrófagos y células gigantes muy activas y además las fibras colágenas que invadieron el implante lo disgregaron. En la última semana de estudio el tamaño del implante disminuyó considerablemente y sólo se encontraron restos del biocompósito y a su alrededor escasa cantidad de macrófagos fagocitando los restos. Esto demuestra que el compuesto es estable alrededor de un mes y luego es evidente su biodegradación en la medida que avanza el tiempo, siendo casi completamente biodegradado en 4 meses.

Estos resultados son casi idénticos a los obtenidos cuando se usó matriz de quitosano (Vandervord *et al*, 2001) y HAP + quitina (Ge *et al*, 2004). Los autores informan en sus experimentos, que no hubo una respuesta inflamatoria aguda ni alérgica, las matrices que ocuparon no fueron tóxicas, las mallas fueron degradadas por macrófagos y dentro de sus conclusiones estas matrices podrían ser buenas candidatas para ser usados como dispositivos temporales durante la regeneración ósea.

Por otra parte, el control positivo utilizado fue de matriz de hueso de rata desmineralizado. La razón del uso de este tipo de control, fue que está comprobado que lo mejor para inducir formación de hueso en un lugar distinto al hueso, es una matriz alogénica y desmineralizada (Pinholt *et al*, 1990). Por lo tanto, quisimos ocupar este control para observar las diferencias que existían con el implante, ya que quizás al estar compuesto por HAP podría ser un estímulo para la calcificación en un sitio ectópico.

Ahora bien, los hallazgos histopatológicos del control positivo, de matriz de hueso de rata desmineralizada fueron bastantes concluyentes. Desde la 2ª semana post implantación de esta matriz, se indujo la formación de nuevo hueso a través de osificación directa e indirecta en menor proporción. Al igual que el implante durante la 1ª semana la

matriz de hueso fue envuelta por una densa capa de tejido fibroblástico y hubo reacción inflamatoria leve que rápidamente cedió y ya a la 2ª semana una fina capa de tejido fibroblástico envolvió la matriz y actuó como periostio. En la 4ª semana, la matriz comenzaba a ser recalificada y en la última semana del estudio la matriz se transformó en hueso mineralizado con periostio y cavidad medular adiposa. La razón por la cual se regeneró el hueso en el subcutáneo, puede deberse a que a pesar de estar descalcificado, la matriz se mantiene viable conservando sus proteínas colágenas, proteínas no colágenas y factores de crecimiento que estimulan la migración, proliferación, diferenciación celular y mineralización de la matriz. Esto demuestra que para inducir la regeneración en un sitio distinto al hueso es necesaria la estimulación con factores de crecimiento, proteínas y células propias del hueso. El compósito no fue capaz de inducir calcificación en subcutáneo de ratas a diferencia del estudio (Ge *et al*, 2004), donde las matrices de quitina + HAP si promovieron la calcificación.

En conclusión, todos los hallazgos histopatológicos del comportamiento del implante en subcutáneo apuntan a su inocuidad en este tejido y en este modelo animal. Al no inducir una respuesta inflamatoria aguda, reacción a cuerpo extraño o reacción alérgica, ya que no se encontraron eosinófilos en ninguno de los tiempos, se puede decir que cumple con una de las propiedades de la biocompatibilidad que es la inmunotolerancia. Además gracias a los componentes del biocompósito multilaminar y su porosidad fácilmente se neovascularizó y fue invadido por fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatorias y macrófagos, estos hallazgos nos indican que el implante es capaz de conducir la vascularización e inducir celularidad y integrarse con el tejido circundante, tres propiedades de la biocompatibilidad. Además el implante es biodegradable, otra de las características esperada en el estudio y que coincide con los resultados de otros autores con respecto a las propiedades del quitosano (Miyazaki *et al*, 1981).

Por lo tanto, según las normas ISO 10993 y los resultados positivos de inmunotolerancia, el implante siguió su evaluación como dispositivo médico. Como segunda etapa, se implantaron trozos del biocompósito en lesiones óseas de tibias de conejos. Antes de ser implantado el biocompósito, fue introducido en aspirado de médula ósea para que penetraran células osteogénicas y factores de crecimiento que sirven como estímulos de la regeneración ósea y que faltaron en la etapa previa.

Los resultados del estudio histológico, *in vivo*, en tibias de conejos durante las 1ª y 2ª semana de implantado el biocompósito multilaminar mostraron una reacción inflamatoria aguda con gran cantidad de células inflamatorias y predominio de polimorfonucleares alrededor del implante, lo cual no difiere con lo observado en el subcutáneo, aunque la reacción inflamatoria fue más intensa que en ratas. Además se observó gran cantidad de calcio precipitado en la superficie del implante, lo cual es indicativo que los estímulos que faltaron en el subcutáneo de rata fueron entregados al implante por el aspirado de médula ósea, el cual fue embebido antes de ser implantado. El ambiente, en el cual, se encontraba el implante también ayudó a la precipitación de calcio. Acompañado de depósito de calcio, también el periostio penetró a través del implante e infiltró la malla porosa con células osteoprogenitoras, osteoclastos y gran cantidad de neovascularización. Esto comprueba que el implante tiene un claro potencial osteoinductivo y osteoconductor. El control durante las 2 primeras semanas, mostró una inflamación moderada en el sector de la lesión y rápidamente comenzó a repararse a través de la formación de trabéculas óseas por osificación directa e indirecta.

Entre la 4ª y 8ª semana del estudio, el implante presentó una fuerte actividad osteoclástica periférica con células gigantes y entre este proceso se comenzó a sintetizar matriz osteoide a través de gran cantidad de osteoblastos dispuestos en la periferia. La inflamación cedió durante este periodo. El control sin implante, durante estas semanas continuó su regeneración en fase de reparación; las corticales se unieron, las trabéculas óseas se organizaron, y el sitio de la lesión prácticamente desapareció.

En la última semana del estudio tanto el experimental como el control presentan las mismas características. El implante ya había sido biodegradado, y en la zona que ocupaba el implante se observó hueso inmaduro, unos pocos osteoblastos y osteoclastos. En el control también se encontró este tipo de tejido y células. Esto demuestra que histológicamente se encuentran en la misma fase de remodelación, a pesar que la regeneración sin implante fue más rápida que con implante, esto debido seguramente al tamaño reducido de la lesión.

Con respecto a la biodegradación esta fue evidente entre la 4ª y 8ª semana, ya que en estos dos tiempos se encontraron gran cantidad de osteoclastos alrededor de la malla y presencia de matriz osteoide y capilares entre los focos de actividad osteoclástica. En la 16ª

semana, ya no se encontraron restos del implante solo hueso inmaduro. Se puede decir que el implante en tibias de conejo fue biodegradado e integrado al tejido circundante a una mayor velocidad que en el subcutáneo de ratas. Su biodegradación fue centrípeta, esto quiere decir, desde la periferia hacia el centro, haciéndose cada vez más pequeño en la medida que era reemplazado por neo hueso.

El estudio radiográfico nos revela que la tibia sin implante rápidamente responde a la lesión, ya que en la primera semana hay cambios radiográficos importante, hay unión de corticales y la profundidad de la lesión ha disminuido. Entre las 4 semanas y las 16 semanas prácticamente no hay diferencias, y todos los parámetros medidos se encuentran en normalidad. En cambio, la tibia con implante responde a las 2 semanas y todo el proceso de regeneración se realiza a menor velocidad que en el control. A pesar, de que a las 16 semanas todavía existe una profundidad de lesión 50%, hay unión de corticales y los tejidos están normales. Estos resultados difieren de los resultados histológicos donde la lesión con implante se observa prácticamente igual a sin implante. Este hecho demuestra que en lesiones de menos de 5 mm, los cabos óseos se regeneran fácilmente en pacientes sanos hasta formar el callo óseo primario (24 y 30 días), sin la necesidad de colocar implantes. En este caso se hizo una lesión de 4 mm, por lo tanto hubiera estado o no el biocompósito igual se hubiera regenerado por el tipo de lesión que se hizo. La razón por la que no se realizó una lesión de mayor tamaño fue porque antes que todo, era necesario saber si el implante era biocompatible en tibias de conejos, si no era impedimento para la regeneración y si era capaz de guiar la regeneración ósea a través del implante. Por lo tanto, se debe seguir investigando y evaluar nuevamente el implante en lesiones mayores a 5 mm para saber si el implante es capaz de balancear la degradación y la pérdida de las propiedades mecánicas con el crecimiento y la formación de hueso en lesiones de mayor magnitud que no se regeneran espontáneamente.

Además de cumplir con todas las características que hacen al biocompósito multilaminar biocompatible, este implante satisface otros requerimientos que son muy importantes; está cuantitativamente disponible, tiene un bajo costo de fabricación, es fácilmente manipulable y amoldable a cualquier forma, la técnica utilizada es sencilla, posee propiedades de superficie tanto químicas como topográficas, ya que las células fácilmente se adhieren a la superficie y migran a través de la matriz tridimensional y es

esterilizable. Además por presentar poros interconectados facilita la neovascularización y la entrada de células a la matriz. Con respecto a la resistencia a la tensión *in vitro*, se podría decir que soporta la misma carga que el hueso esponjoso, esto en parte dado por la multilaminaridad del biocompósito.

Con estos resultados podemos decir que al ser unidos el quitosano y la HAP en un biocompósito poroso y multilaminar, adicionado de células osteogénicas y factores de crecimiento se lograron las condiciones de biocompatibilidad necesarias y se obtuvo una regeneración guiada de nuevo hueso en la lesión ósea.

X. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Tras cuatro meses de seguimiento el implante fue paulatinamente biodegradándose en la medida que era fagocitado.
- Tanto en subcutáneo de ratas como en tibias de conejos existe una buena respuesta tisular al implante sin respuesta inflamatoria exagerada del tejido ni tampoco la formación de tejido fibroso, por lo tanto podemos decir que el implante es inmunotolerado.
- Las propiedades evaluadas de osteoconducción, osteoinducción, osteointegración e inmunotolerancia, hablan a favor de su biocompatibilidad.
- Tomando en consideración que el objetivo de este estudio era evaluar un biocompósito multilaminar como implante óseo, se puede decir que según los resultados obtenidos se demuestra el potencial del compósito como sustituto para ser usado como implante de hueso.
- El biocompósito multilaminar adicionado de factores de crecimiento y células osteogénicas logró condiciones de biocompatibilidad necesarias y obtuvo una regeneración guiada de hueso, por lo tanto se considera la hipótesis como verdadera.
- Además de la biocompatibilidad, se ha demostrado que el implante evaluado cumple con muchos requisitos comunes para los implantes y necesarios para la Ingeniería de tejidos.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- ALBREKTSSON, T., JOHANSSON, C. 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* 10 Suppl. 2: 96-101.
- ARIAS, J.I. 2007. Nuevos enfoques para mejorar las propiedades mecánicas y biológicas de compuestos cálcicos para su uso como substitutos óseos. *REDVET. Rev. electrón. vet.* Vol. VIII. Nº 12. [en línea]. <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>>. [consulta: 15-04-2008]
- BRAUN, W., RUTER, A. 1996. Fracture healing. Morphological and physiological aspects. *Unfallchirurg.* 99(1):59-67.
- CRUESS, R. L., DUMONT, J. 1985. Healing of Bone. *Textbook of Animal Orthopedics.* [en línea]. <http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_03/03mast.asp#1>. [consulta: 24- 05-2007].
- FALKE, G. F., ATALA, A. 2000. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch. Argent. Pediatr.* 98 (2):103-105.
- FERNÁNDEZ-TRESGUERRES, I., ALOBERA, M., PINGARRÓN, M., BLANCO, L. 2006. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med. Oral Patol. Oral. Cir. Bucal* 11: 47-51.
- GARTNER, L. P., HIATT, J. L., STRUM, J. M., SWANSON, T. A., KIM, S. I., SCHNEIDER, A. S. 2002. *Cell Biology and Histology.* Williams & Wilkins. 384 pp.
- GE, Z., BAGUENARD, S., YONG, LIM, L., WEE, A., KHOR, E. 2004. Hydroxyapatite–chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials* 25: 1049–1058.
- GETTY, R. 1982. Osteología general. En: *Anatomía de los Animales Domésticos.* Sisson, S., Grossman, J.D, Salvat Editores S.A. 5ª edición, Barcelona, España. 22-28.
- KARAGEORGIU, V., KAPLAN, D. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26: 5474–5491.
- LEE, Y., PARK, Y., LEE, S., KU, Y., HAN, S., KLOKKEVOLD, P., CHUNG, C.H. 2000. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan / tricalcium phosphate sponge carrier. *J. Periodontol.* 71: 418- 424.

- MAUNEY, J. R., VOLLOCH, V., KAPLAN, D. L. 2005 . Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng.* 11(5):787-802.
- MIYAZAKI, S., ISHII, K., NADAI, T. 1981. The use of Chitin and Chitosan as drug carriers. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 3067-3069.
- MORGAN, J. P., LEIGHTON, R. L. 1995. *Radiology of Small Animal Fracture Management.* WB Saunders. 328 pp.
- MORSE, A. 1945. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J. Dent. Res.* 24 (3): 143-153.
- NEREM, R. M. 1991. Cellular engineering. *Annals of Biomed. Eng.* 19: 529-545.
- PIERMATTEI, D.L, FLO, G.L. 1997. Handbook of small animal orthopedics and fracture repair. *Bone Grafting* 3:28-153.
- PINHOLT E.M., BANG, G., HAANAES, H. R. 1990. Alveolar ridge augmentation by osteoinduction in rats. *Scand. J. Dent. Res.* 98: 434-441.
- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E. 2004. *Biomateriales Science. An Introduction to Materials in Medicine* 2nd Edition, Elsevier Academic Press, San Diego, California, U.S.A. 829 pp.
- SALAMANCA, S., SANTIAGO, E. 2004. Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales. Universidad de Barcelona, Barcelona, España. [en línea]. <http://www.tdx.cat/TDX-0318105-135753>. [consulta 16-04-08].
- SANZANA E. 2006. Evaluación de un cemento fosfocálcico como sustitutivo óseo in vivo en conejos. *Rev. Chilena de Cirugía.* Vol 58. Nº 6: 431-440
- SERRANO, R. 2007. El quitosano puede ser un buen regenerador del cartílago. *DiarioSalud.* Madrid, España. [en línea]. http://www.diariosalud.net/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=7051 [consulta 16-04-08].
- TOTUSAUS, X. 2005. Hidroxiapatita como material de relleno en defectos óseos. [en línea]. <http://www.mevepa.cl/modules.php?name=News&file=article&sid=675> [consulta 29-05-07].

VANDEVORD, P.J, MATTHEW, H.W, DESILVA, S.P, MAYTON, L, WU, B., WOOLEY, P.H. 2002. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*. 59 (3): 585-590.

VASERMAN, C. A. 2004. Regeneración ósea guiada. Alternativa terapéutica de recuperación ósea en cavidades. Vol. XIII. N° 139. [en línea]. <<http://www.diagnostico.com.ar/diagnostico/dia139/d-rog139.asp>> [consulta 16-04-08].

YANG, S., LEONG, K.F., DU, Z., CHUA, C.K. 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 7: 679-689.

ZHANG, Y., ZHANG, M. 2004. Cell growth and function on calcium phosphate reinforced chitosan scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 15:55-60.