



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES

**EVALUACIÓN *IN VIVO* EN MODELO ANIMAL DE LA CAPACIDAD DE
BIONANOCOMPÓSITOS A BASE DE NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO
BIOACTIVO PARA ESTIMULAR LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO**

Felipe Andrés Cuadra Ramírez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Alfredo Von Martens Castro

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1130342

Santiago – Chile

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES

**EVALUACIÓN *IN VIVO* EN MODELO ANIMAL DE LA CAPACIDAD DE
BIONANOCOMPÓSITOS A BASE DE NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO
BIOACTIVO PARA ESTIMULAR LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO**

Felipe Andrés Cuadra Ramírez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Alfredo Von Martens Castro

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1130342

Santiago – Chile

2017

ÍNDICE

RESUMEN	6
Introducción	6
Hipótesis	6
Objetivo.....	6
Materiales y métodos.....	6
Resultados	7
Conclusión	8
INTRODUCCIÓN	9
MARCO TEÓRICO	11
1. Alternativas actuales en reparación y regeneración ósea	11
2. Tipos de injertos según su origen: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos e injertos aloplásticos.	12
3. Ingeniería de tejidos y nanotecnología	15
4. Matriz o andamio o scaffold	18
5. Señales bioactivas	21
6. Bionanocompósitos.....	22
7. Modelo animal: estudios in vivo	25
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
General	28
Específicos.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Materiales	29
1.1. Bionanocompósitos	29
1.2. Implantación experimental in vivo y eutanasia	29
1.3. Equipamiento	30

2. Metodología	30
2.1. Procesamiento de las muestras	34
2.2. Análisis histológico convencional.....	36
2.3. Análisis mediante microtomografía computarizada (Micro-CT) de rayos x	38
2.4. Análisis estadístico	38
RESULTADOS	39
1. Histología convencional y microscopía óptica	39
2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	39
3. Análisis de composición elemental mediante EDX.....	42
4. Histomorfometría de las imágenes SEM 30x.....	46
5. Análisis mediante Microtomografía computarizada (Micro - CT).....	47
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	66
Anexo 1: Certificación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile	66
Anexo 2: Histología convencional y microscopía óptica.....	67

RESUMEN

Introducción

La reparación de tejidos óseos en odontología es una necesidad en distintos tipos de cirugías. Sin embargo, los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos que existen en el mercado presentan limitada capacidad osteogénica que no siempre permiten obtener resultados clínicos satisfactorios. Por esta razón la ingeniería de tejidos cobra importancia, ya que esta disciplina busca la síntesis de injertos aloplásticos o biomateriales sintéticos, que superen las capacidades regenerativas de los injertos tradicionales. En tesis anteriores, pertenecientes a este mismo proyecto se sintetizaron y evaluaron *in vitro* bionanocompósitos a base de andamios de quitosano/gelatina (QG) y poliuretano biodegradable (PU), cargados con nanopartículas de cerámicas de vidrio bioactivo (nBG y nMBG). Los resultados concluyeron que estos biomateriales son capaces de inducir la formación de apatita y la diferenciación osteogénica de células madre. El presente trabajo de tesis tiene como objeto evaluar *in vivo* la capacidad de regeneración de tejido óseo de los mismos bionanocompósitos, utilizando para ello un modelo animal.

Hipótesis

Bionanocompósitos cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo presentan capacidad de regeneración ósea *in vivo* superior a la presentada por los andamios puros.

Objetivo

Comparar la capacidad de regeneración ósea *in vivo* de bionanocompósitos cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo respecto a los andamios puros y los controles.

Materiales y métodos

Los bionanocompósitos a utilizar en este trabajo, fueron preparados y evaluados *in vitro* en tesis anteriores del presente proyecto. Los

bionanocompósitos evaluados fueron: bionanocompósitos de quitosano/gelatina cargados nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG) y nanoesferas de vidrio bioactivo mesoporoso (nMBG) en forma de esponjas porosas (nBG/QG-SP y nMBG/QG-SP) y de esferas en estado gel (nBG/QG-SF y nMBG/QG-SF) (Cádiz, Covarrubias, y cols., 2015) y el andamio puro DE de quitosano/gelatina sin las nanopartículas (QG-SP). Además se probaron andamios de poliuretano puro (PU) y con nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG/PU y nMBG/PU) (Agüero, Covarrubias, 2015). Como referencia de material clínico se utilizó el aloinjerto comercial Puros® Particulate Allograft (Zimmer Dental).

Los bionanomateriales se evaluaron *in vivo* utilizando un protocolo de modelo animal en rata, el cual fue aprobado por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Protocolo CBA# 0542 FMUCH, Anexo 1). Todo el procedimiento estuvo regido de acuerdo a protocolos del comité de bioética institucional, correspondiente a los cuidados antes, durante y después del procedimiento quirúrgico.

Se utilizaron en total 22 ratas (Sprague Dawley) en las cuales se generó un defecto óseo que cumplía con el tamaño crítico del defecto (4 mm) y luego se implantaron un injerto en cada uno. Después de 8 semanas de implantación los animales fueron eutanasiados y se obtuvo muestras de tejido, correspondiente a la zona del defecto óseo en la cual se realizó el injerto. Las muestras de tejidos obtenidas fueron incluidas en resina y caracterizadas mediante análisis con microscopía electrónica de barrido en modalidad backscattering (SEM-BS), análisis elemental con energía dispersiva de rayos X (EDX) y microtomografía computarizada de rayos - x (Micro-CT).

Resultados

Como era de esperar el defecto óseo sin tratamiento no reparó por sí solo, mientras que todos los biomateriales estudiados presentaron capacidad de estimular la formación de tejido óseo en diferentes grados. En control positivo Puros® reparó con corticales continuas pero de menor espesor. Los bionanocompósitos de nBG/QG-SP presentaron en general corticales continuas, y de espesor similar al resto de las corticales del mismo hueso. Los

bionanocompósitos a base de PU presentaron formación de tejido óseo con corticales abombadas, irregulares, con centros de densidad mixta que invaden el espacio medular. Los compósitos de nBG/QG-SF y de nBG/QG-SP fueron quienes presentaron mejor capacidad de estimular la formación de tejido óseo, en términos de cantidad y densidad de hueso formado. Estos materiales presentaron también una capacidad regenerativa mayor que el aloinjerto comercial Puros®. Los resultados demuestran que los materiales con la nanopartícula nBG son más eficientes que aquellos preparados con nMBG lo anterior debido a que nBG posee menor tamaño de partícula (70 nm) y por lo tanto posee mayor tasa de disolución y liberación de iones capaces de inducir la formación de hidroxiapatita. Con respecto al tipo de polímero de los andamios, el QG presentó mejores propiedades que PU, debido principalmente a la mayor biodegradabilidad de QG respecto a PU. Se encontró además que en cuanto los formatos de presentación, esferas en estado gel y esponjas liofilizadas, ambos presentan características favorables y su utilidad dependerá de las características clínicas del defecto que se requiera reparar.

Conclusión

Todos los bionanocompósitos con vidrio bioactivo fueron capaces de inducir calcificación y reparación de los defectos óseos en modelos animal en ratas, en especial los scaffolds cargados con nBG (nBG/QG-SP y nBG/QG-SF), quienes presentaron resultados superiores incluso que el aloinjerto comercial Puros®.

INTRODUCCIÓN

Como ya es bien sabido, la pérdida de dientes producto de enfermedad periodontal, traumas, patologías neoplásicas o como consecuencia de caries no controladas que terminan afectando la integridad ósea, genera además de la pérdida del diente, pérdida de volumen óseo, tanto en sentido bucolingual como apicocoronal (Schropp y cols., 2003). Este problema sumado a los altos índices de desdentamiento parcial y completo en nuestro país, del 79,7% en población adulta entre 34 y 44 años, genera un problema clave, (Ministerio de salud, 2010) la pérdida de hueso dificulta los posibles tratamientos además de afectar negativamente a su pronóstico”.

Un maxilar o mandíbula con pérdida ósea del reborde alveolar reduce la posibilidad y empeora el pronóstico de un tratamiento rehabilitador mediante implantes óseo integrados (Degidi y cols., 2007).

Otra posibilidad de tratamiento para recuperar la eficiencia del sistema estomatognático además de la estética por la pérdida dentaria, es el uso de prótesis dentales removibles, parciales o totales. Sin embargo el pronóstico de este tratamiento depende en gran medida de la cantidad de soporte óseo que exista en los huesos maxilares, lo que favorece tanto la retención como el soporte de las prótesis.

Como solución a esta problemática, y para mejorar los pronósticos de tratamiento de implantes y cuando corresponde también de las prótesis removibles, se suelen utilizar injertos conectivos y/u óseos, para devolver volumen y altura ósea en distintas situaciones clínicas como:

- Necesidad de aumento de rebordes alveolares atróficos.
- En la profilaxis de la reabsorción de los rebordes alveolares.
- Cirugías ortognática.
- Cirugías de camuflaje.
- Para rellenar defectos óseos creados por quistes o tumores.

En la elección de la técnica influye también el tipo de tratamiento. Si la rehabilitación es en base a prótesis fija plural (PFP) el aumento con injertos blandos podría ser suficiente sin embargo para implantes la reconstrucciones en la mayoría de los casos requiere tantos tejidos blandos y duros. (Miller PD, 1993)

A pesar de la creciente investigación asociada al desarrollo y uso de biomateriales no autógenos, éstas aún no han conseguido reproducir las mismas características del propio hueso donante del paciente, hasta ahora considerado "gold standard" para procedimientos quirúrgicos en que se requiera grandes o moderadas reparaciones de volumen óseo. (Moore y cols., 2001; Monzón y cols., 2014), e incluso se han reportado una serie de desventajas que limitan su aplicación clínica. Por lo demás, sus propiedades consiguen generalmente reparar el tejido óseo, no así regenerarlo, entendiéndose la regeneración como la formación de un tejido nuevo con características estructurales y funcionales equivalentes al tejido original.

Esta problemática ha puesto en movimiento distintas investigaciones durante los últimos años, que tienen como objetivo sintetizar un injerto que cumpla todas las propiedades deseables para la regeneración/reparación de los tejidos óseos. En este contexto aparecen la ingeniería de tejidos y biotecnología como pilares de investigación, los cuales han logrado desarrollar nuevos materiales y métodos para la reparación de tejidos óseos, con gran potencial para aplicaciones clínicas en distintas áreas de la salud. (Saska y cols., 2015).

Los principios de la ingeniería de tejidos se basa en tres elementos que deben estar en sinergia: una matriz (andamio), células y señales (proteínas, péptidos, citoquinas, factores de crecimiento) (Saska y cols., 2015).

El presente trabajo consiste en la evaluación de la respuesta *in vivo*, en modelo animal de rata Sprage Dawley, de 5 bionanocompuestos ya sintetizados en tesis anteriores adscritas al mismo proyecto FONDECYT, correspondientes a nBG/QG-SP y nano-BG/PU y su respectiva comparación con los controles y el gold standard del mercado (Puros®).

MARCO TEÓRICO

1. Alternativas actuales en reparación y regeneración ósea

Las estrategias actuales en **reparación** de tejidos óseo apuntan a disminuir los periodos de sanación junto con mejorar la predictibilidad de los tratamientos a corto, mediano y largo plazo, disminuyendo a su vez el número y severidad de complicaciones, la cantidad de intervenciones quirúrgicas y la morbilidad del paciente (Buser, 2009). Para llevar a cabo esta labor, las alternativas de tratamientos actuales involucran el uso de injertos óseos provenientes de distintas fuentes, entre ellas, **autólogos o autoinjertos** (provenientes del propio cuerpo del individuo), **homólogos o aloinjertos** (provenientes de un individuo de la misma especie), **heterólogos o xenoinjertos** (provenientes de individuos de otra especie) y **aloplásticos** (materiales sintéticos). (Kaigler y Mooney, 2001)

Los injertos óseos en general tienen una doble función: mecánica y biológica. La mecánica corresponde a la función de soporte frente a distintas cargas biomecánicas. La biológica corresponde a la función de promover la génesis, el crecimiento y la maduración de nuevos tejidos óseos. Dependiendo del resultado clínico que se busque, una de las funciones puede ser más importante que la otra (Calvo y cols., 2011). En la interfase injerto óseo - huésped existe una compleja relación donde múltiples factores pueden intervenir en la correcta incorporación del injerto; dentro de ellos destacan la zona de implantación, vascularización del injerto, interfase hueso-huésped, inmunogenética entre donante y huésped, técnicas de conservación, factores locales y sistémicos diversos (hormonales, uso de medicamentos, calidad ósea, enfermedades crónico degenerativas) y las propiedades mecánicas (que dependen del tamaño, la forma y tipo de injerto utilizado). (Gazdag y cols., 1995)

Además de estas dos funciones de los injertos óseos, estos poseen tres propiedades que determinan su mejor o peor funcionamiento e integración, las que básicamente son: (Whang y cols., 2003):

- **Osteogénesis:** síntesis de hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere células capaces de generar hueso.
- **Osteoinducción:** proceso por el que las células madres mesenquimatosas son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas 2, 4 y 7, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleucinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico, factores estimuladores de las colonias de granulocitos y factores estimuladores de las colonias granulocitos y macrófagos. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina. Además de estos factores de crecimientos, otras moléculas sintéticas son capaces de inducir la osteodiferenciación, como por ejemplo la hidroxiapatita sintética (HA) y el vidrio bioactivo (BG).
- **Osteoconducción:** proceso en el que tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimales, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón ya formado, determinado por la biología del injerto y el entorno biomecánico del mismo.

De manera ideal un injerto óseo debe tener estas tres propiedades, además de ser biocompatible y proporcionar estabilidad biomecánica.

2. Tipos de injertos según su origen: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos e injertos aloplásticos.

Los **autoinjertos** provienen del mismo individuo que es receptor, y proporciona mejores resultados, ya que es el único que cumple con las 3 propiedades de regeneración ósea (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), además

evita la transmisión de enfermedades y el rechazo inmunológico. Es por esto que es considerado como el material natural "gold standard".

Pese a esto, existen problemas con el uso de autoinjertos óseos, como la insuficiente cantidad de injerto, riesgo de morbilidad posquirúrgica significativa en la zona donadora de hasta 30%, que se puede manifestar como: infección, dolor, hemorragia, debilidad muscular y/o lesión neurológica. También implica mayor tiempo quirúrgico, más pérdida de sangre y un costo adicional. (Stevenson, 1999; Tortolini y cols., 2012).

Se consideran como **aloinjertos** los tejidos provenientes de un individuo de la misma especie que el receptor. Como características cuenta con capacidad osteoinductiva y osteoconductora, y se comporta como una estructura que permite la neoformación ósea a partir del remplazo gradual que sufre el injerto por el hueso del huésped, haciendo este proceso lento y con considerable pérdida de volumen. (Betts, y cols., 1991). Existen 3 formas de presentación de los aloinjertos óseos: congelados, desecados (liofilizados) y desmineralizados.

Las ventajas de los aloinjertos sobre los autoinjertos están en relación a su mayor disponibilidad, ausencia de morbilidad de la zona dadora, menor tiempo quirúrgico y menor sangrado, la capacidad de reconstrucción de grandes defectos, etc. Una de las grandes cualidades de los aloinjertos es que estructura de la matriz ósea permanece incluso cuando todas las células que lo componen no se encuentren vitales, y es colonizada de nuevo por células procedente del lecho receptor en un fenómeno llamado "sustitución por invasión" (Espinosa, 2004). Entre sus desventajas están los tiempos de incorporación más prolongados y la capacidad osteoconductiva y osteoinductiva menores comparada con el autoinjerto. (Gazdag y cols., 1995).

El mayor problema que presentan está en relación con la transmisión de enfermedades (Barbour, y cols., 2003), sin embargo la adecuada selección de donante, el desarrollo de las técnicas de estudio microbiológico, la preservación de tejidos y esterilización con distintas dosis de radiación gamma han reducido esta complicación, que por ejemplo en el caso del VIH, se estima en un riesgo de transmisión menor que 1 en 1,6 millones. (Buck y cols., 1989)

Los **xenoinjertos** corresponden a tejido óseo transferido entre dos individuos de especies distintas. Estos injertos pueden provenir de huesos de mamíferos y exoesqueletos de coral (Biocoral®). El hueso derivado de bovinos ha sido comunmente utilizado, a pesar de que existan otras fuentes disponibles como porcino o murino. Algunas formas comerciales de hueso obtenido de bovinos son Bio-Oss®, Endobone®, Laddec®, entre otros. Cabe mencionar que el contenido orgánico es completamente removido, quedando solamente la matriz inorgánica, la cual es osteoconductiva pero sin las cualidades osteoinductivas dadas por los elementos orgánicos (Sándor y cols., 2003).

Como ventaja destaca el hecho de que se puede obtener en mayores cantidades más fácilmente, se disminuye la morbilidad al eliminar el sitio donante disminuyendo así el riesgo de hemorragias y de daño neurológico en el paciente, pero tiene como desventaja la posibilidad de transmisión de enfermedades bacterianas ya reportadas como encefalopatía bovina espongiiforme debido a la potencial transmisión del virus a través de productos derivados de bovinos (Bons y cols., 2002).

El rechazo inmunológico de los aloinjertos y xenoinjertos es otro problema común; es el resultado de una reacción celular del huésped a los antígenos trasplantados. Los antígenos responsables de este rechazo son los pertenecientes al sistema del antígeno de histocompatibilidad mayor (MHC). Sin embargo, el empleo de algunos métodos pueden disminuir la respuesta antigénica del huésped, como el tratamiento con inmunosupresores, que se ha convertido en una necesidad práctica en todas las combinaciones donante-receptor. A pesar de que la inmunosupresión ha permitido lograr grandes avances en la supervivencia de los injertos, también tiene grandes contratiempos, ya que aumenta la sensibilidad a las infecciones oportunistas provocadas por hongos, virus y otros microorganismos. (Robbins y Cotran 1998)

Por último, los **injertos aloplásticos** corresponden a sustitutos óseos sintéticos entre los que se encuentran los fosfatos de calcio y los vidrios bioactivos (Esposito y cols., 2007). Poseen propiedades osteoconductoras y

osteoinductivas (Maiorana, y cols., 2006). Se utilizan aislados o en combinación con otros materiales de injerto (Esposito y cols., 2007).

Como se puede deducir los distintos injertos poseen distintas ventajas y desventajas, que facilitan su elección o bien restringen su uso debido a los riesgos que significan. Es por esto que la ingeniería de tejidos toma sentido y aparece como una ciencia cuyo objetivo principal es la creación de materiales sintéticos que asimilen de la forma más exacta posible a los tejidos naturales del donante, de tal manera de disminuir lo máximo posible el riesgo de morbilidad de su uso.

3. Ingeniería de tejidos y nanotecnología

La regeneración tisular es la respuesta que consigue la restitución *ad integrum* del tejido tras un trauma, es decir la formación de un tejido idéntico al original, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al inicial. En este sentido el hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión. (Davies y Hosseini, 2000).

Es en este contexto, en el intento de regenerar tejidos perdidos o dañados, es que la **ingeniería de tejidos (IT)** toma un papel trascendental, la cual se define como: “la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. El objetivo de la ingeniería de tejidos es recopilar ideas o teorías que restauren, mantengan o mejoren los tejidos dañados u órganos completos.” (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, NIBIB USA, 2013).

La ingeniería de tejidos se basa en tres principios que deben estar en sinergia y que se corresponden a su vez con las 3 propiedades ideales que debe tener un injerto óseo: una matriz (andamio o scaffold), células (células progenitoras como células madre mesenquimales) y señales (factores de crecimiento, moléculas bioactivas) (Saska y cols., 2015). De esta forma las células deben estar dispuestas en matrices biocompatibles y tridimensionales al igual que los tejidos originales, con apropiadas señales como factores de crecimiento o

moléculas bioactivas, para así regenerar y mantener tejido óseo. (Jones y Yang, 2005).

Pese a los avances en tecnología y conocimientos, no existe aun un material sintético ideal que permita la regeneración ósea, debido a que, para que tal proceso sea posible, el injerto en sí debe cumplir con los principios de la ingeniería de tejidos y con las cualidades ideales de un injerto óseo (Fig. 1) (Saska y cols., 2015):

- Tener células madres mesenquimales, los osteoblastos y osteocitos , que le otorguen la el **potencial osteogénico**;
- Poseer un andamio o matriz biocompatible que permita el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y que estimue a que las células óseas crezcan en su superficie, otorgandole su capacidad de **osteoconductividad**;
- Tener señales, que pueden ser factores de crecimiento o moléculas bioactivas que sean capaces de estimular a las células mesenquimales a diferenciarse en osteoblastos para favorecer el proceso de osteogénesis, lo que a su vez le otorga el **potencial osteoinductivo** al tejido en cuestión. (Polo-Corrales y cols., 2014).

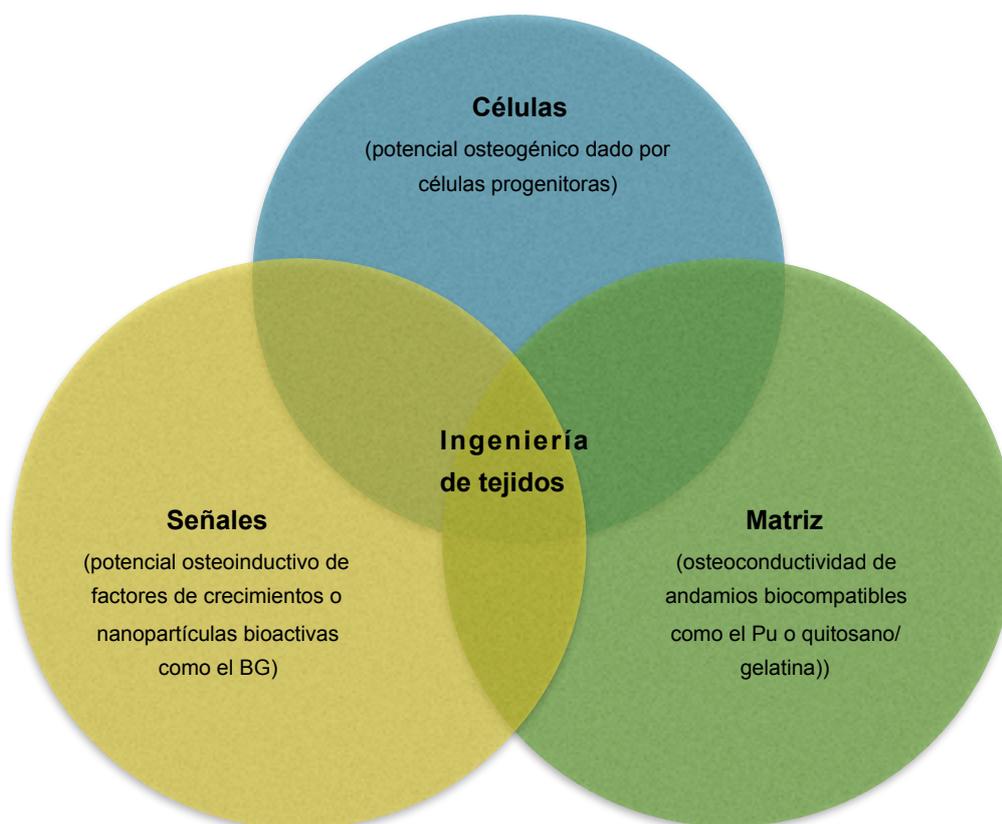


Fig 1. Esquema de los principios de la Ingeniería de tejidos, y su relación con las propiedades ideales de un injerto óseo.

En la búsqueda de crear materiales que se asemejen y potencien la reacción propia del huésped para regenerar un tejido, la ingeniería de tejidos integra los avances en nanotecnología y la creación de nuevos materiales que en tamaños nanométricos presentan mejoradas propiedades osteoinductivas que sus equivalentes en tamaños de mayor escala, como la hidroxiapatita nanométrica (nHA) y el vidrio bioactivo nanométrico (nBG), para generar injertos óseos con prometedoras propiedades y resultados clínicos.

La **nanotecnología** se define como “la creación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales a través del control de la materia en la escala nanométrica (1-100 nm), y explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas y biológicas) a esa escala (NASA) (Mendonça y cols, 2008).

Los nanomateriales exhiben propiedades únicas de superficie (topografía, química, humectabilidad y energía de superficie), debido a un aumento significativo en el área superficial, rugosidad y energía superficial, lo cual se

traduce en una mayor reactividad, comparado con los materiales convencionales o microestructurados. Estas propiedades de superficie median la adsorción específica de proteínas y la bioactividad celular, regulando el comportamiento celular y dictando la regeneración de tejidos. Estudios previos han demostrado que los materiales nanoestructurados con propiedades de superficie favorables pueden promover mayor cantidad de interacciones específicas de proteínas para estimular de manera más eficiente el crecimiento de nuevo hueso, en comparación con los materiales convencionales. Todos estos mecanismos son clave para comprender por qué los nanomateriales tendrían propiedades superiores en relación a los materiales microestructurados para estimular la regeneración ósea (Nayar y cols., 2011).

El objetivo final de la IT es el desarrollo de un “constructo bioactivo” (Marolt y cols., 2010). Esto involucra la siembra de células en un andamio puro o compósito, su cultivo *in vitro* y su implantación final en el cuerpo para producir la regeneración del tejido dañado o perdido del receptor (Rabkin y Schoen, 2002).

4. Matriz o andamio o scaffold

La **matriz** corresponde a un andamio temporal, es decir una matriz extracelular artificial, que actúa como sustrato y soporte para promover la adhesión celular sin obstaculizar la proliferación y al mismo tiempo actúa como plantilla para guiar la formación de un nuevo tejido. El andamio puede ser desarrollado utilizando polímeros naturales o sintéticos. Los polímeros naturales facilitan la unión celular y el mantenimiento de la función de diferenciación, por lo tanto, los polímeros biomiméticos naturales pueden ser ampliamente utilizados como medio de andamiaje para la regeneración tisular. (Mao y cols., 2003).

Las características ideales que debe tener el andamio son: ser biocompatible (no tóxico); promover la adhesión y proliferación celular; tener propiedades mecánicas similares a las del tejido a reemplazar, siendo capaz de soportar las cargas biomecánicas del ambiente en que se encuentre inserto; tener una arquitectura porosa tridimensional, la cual es de suma importancia, ya que ha

de servir como una matriz optimizada que permita la proliferación celular, revascularización y la difusión de nutrientes entre ellas, la matriz celular y el entorno que la rodea; debe degradarse en productos no tóxicos, que puedan ser fácilmente reabsorbidos o excretados por el cuerpo a una tasa que sea compatible con la producción de nuevo tejido; ser capaz de ser procesado de manera económica en formas y dimensiones anatómicas útiles, y ser esterilizable para uso clínico (Griffith, 2002; Deville y cols., 2006; Rahaman y cols., 2011). La porosidad, tamaño e interconexión de los poros son parámetros críticos. En general, poros interconectados con un diámetro de 100 micras o más y una porosidad mayor a 50% son considerados en la mayoría de los casos, requerimientos mínimos para permitir el crecimiento y función tisular (Rodríguez y cols., 2002; Wu X y cols., 2003).

Los materiales utilizados comúnmente en la fabricación de andamios para aplicaciones de IT son polímeros biodegradables naturales o sintéticos (Griffith, 2000). Los polímeros sintéticos tienen propiedades mecánicas relativamente buenas, y su forma y tasa de degradación son fácilmente modificables. Sin embargo, sus superficies son hidrofóbicas y no poseen señales de reconocimiento celular. Los polímeros naturales tienen la ventaja de ser biodegradables y poseer componentes similares a componentes extracelulares naturales, lo que podría influir positivamente en el soporte, adhesión y función celular, no obstante, algunos de ellos poseen propiedades mecánicas limitadas. Ejemplos de estos materiales son: polímeros sintéticos como el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), polivinilalcohol, poliuretano; y polímeros naturales como el alginato, colágeno, la gelatina, quitina y el quitosano (Sowmya y cols., 2011).

La **gelatina (GEL)** es un biopolímero derivado de proteínas naturales, obtenido por la hidrólisis controlada de colágeno insoluble fibroso. A pesar de que el colágeno presenta antigenicidad en condiciones fisiológicas, la gelatina no posee esta condición (Chvapil, 1977), y es más fácil y menos costosa de obtener en soluciones concentradas. La gelatina ha sido ampliamente utilizada tanto en la industria farmacéutica como en el campo biomédico. Entre sus aplicaciones frecuentes se encuentran dispositivos como cápsulas blandas y duras, microesferas, sellantes para prótesis vasculares, vendajes para heridas

y dispositivos absorbentes para uso quirúrgico (Gelita®). Adicionalmente, como polímero biocompatible, la gelatina ha sido utilizada como vehículo de liberación de moléculas bioactivas (Young y cols., 2005), y para la producción de andamios en aplicaciones de ingeniería tisular (Huang Y. y cols., 2005). Como la gelatina es soluble en medio acuoso, los materiales basados en gelatina para aplicaciones biomédicas a largo plazo, deben ser sometidos a un proceso de entrecruzamiento, que mejora su estabilidad térmica y mecánica.

El **quitosano** es un biopolímero biodegradable, biocompatible, antibacteriano, con baja inmunogenicidad, derivado de la quitina, y ha probado ser bacteriofungiestático y no tóxico *in vivo* (Shi y cols., 2006). Debido a estas propiedades, es ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas como administración de fármacos, apósitos para heridas, membranas de separación, recubrimientos antibacterianos y como andamio en ingeniería de tejidos (Jayakumar y cols., 2009). Además, posee propiedades químicas favorables como la capacidad de formar geles, alta capacidad de adsorción y versatilidad en términos de modificación y combinación con otros polímeros, lo que ha permitido su uso para el desarrollo de una amplia gama de tejidos como injertos vasculares, hueso y cartílago (Shi y cols., 2006). Desde el punto de vista odontológico, las propiedades antibacterianas del quitosano hacen que este sea un material adecuado para el diseño de andamios para la regeneración del hueso alveolar, una vez que estas áreas son altamente susceptibles a la infección bacteriana. Debido a sus propiedades químicas el quitosano también tiene la capacidad de contribuir a la adhesión y proliferación celular.

Por otro lado, y como alternativa sintética, los biocompósitos de **poliuretano (PU)** han sido sintetizados y utilizados para diversos estudios en aplicaciones biomédicas tales como la ingeniería de tejidos blandos (Guan y cols., 2002), tejidos cardíacos. (Alperin y cols., 2005), materiales que tienen contacto con la sangre (Poussard y cols., 2004), implantes de meniscos para rodillas (Spaans y cols., 2000, sistemas con liberación controlada de fármacos (Mahkama, 2003), y también como injerto para tejido óseo (Oliveira y cols., 2012; Ryszkowska y cols., 2010).

5. Señales bioactivas

En cuanto a **las señales o componentes bioactivos** requeridos en ingeniería de tejidos, estos pueden ser naturales, correspondientes a factores de crecimiento, o bien partículas sintéticas, como las biocerámicas. A este último grupo pertenecen la hidroxiapatita y el vidrio bioactivo (nombre comercial: Bioglass®, BG).

El **vidrio bioactivo (BG, CaO-SiO₂-PO₄-NaO)** forma una capa superficial de fosfato carbonatada deficiente en calcio que le permite unirse químicamente al hueso, este comportamiento se conoce como **bioactividad** y se ha asociado a la formación de hidroxiapatita carbonatada sobre la superficie del BG cuando está en contacto con fluidos biológicos (Fig. 2) (Rezwana y cols., 2006). Además se ha reportado en estudios recientes que una cantidad específica de vidrio bioactivo incrementa de manera significativa la respuesta angiogénica en tejidos blandos (Richard, 2005), además de promover la adhesión, crecimiento y diferenciación de osteoblastos. También se ha comprobado que el BG es capaz de inducir la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos (Roether y cols., 2002).

Por todo lo anteriormente descrito, los vidrios bioactivos son considerados como un importante material de regeneración ósea, debido a sus excelentes propiedades de osteoconductividad y osteoinducción.

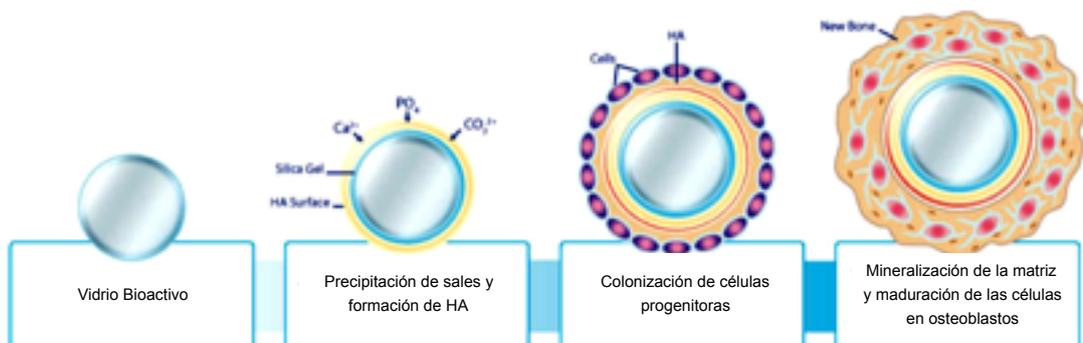


Fig 2. Esquema simplificado del mecanismo de acción del vidrio bioactivo (BG).

Las nanopartículas de estas biocerámicas de HA y BG (nHA y nBG) poseen propiedades bioactivas mejoradas para reparación del tejido óseo. Esto se explica debido a que al ser los cristales más pequeños estos se disuelven más rápidamente que cristales de mayor tamaño de la misma composición química, debido a que poseen mayor área superficial en contacto con el ambiente biológico y a un mayor número de defectos presentes en la trama cristalina (Daculsi y cols.,1989; Suvorova y cols.,1998).

Mediante técnica sol-gel se ha logrado sintetizar estas nanopartículas de BG de alrededor de 70 nm (nBG) en tesis previas a esta (Cádiz, 2015).

También ha sido desarrollado una nueva clase de vidrio bioactivo, denominado **vidrio bioactivo mesoporoso (MBG)**, el que posee una estructura de canal mesoporoso altamente ordenada de tamaños nanométricos y una alta área superficial (Wu C y cols., 2013). El término “mesoporoso” se refiere a los tamaños entre 2 y 50 nm (Selvam y cols., 2001). En comparación con el BG no porosos, MBG posee un área superficial más óptima, junto con la habilidad de inducir mineralización de apatita *in vitro* en SBF y una excelente citocompatibilidad (Alcaide y cols., 2010). Más recientemente, Wu C y cols. (2013) han sintetizado **nanoesferas de MBG (nMBG)** (Fig. 3) con una morfología esférica y estructura mesoporosa interna. El nMBG tiene una alta superficie específica y volumen de mesoporos, además de una excelente capacidad de mineralización de apatita.



Fig. 3. Imagen esquemática de las nanopartículas biocerámicas utilizadas.

6. Bionanocompuestos

Los compósitos bioactivos (Swetha y cols., 2010; Boccaccini y cols., 2010) son materiales compuestos, preparados por la incorporación de partículas cerámicas bioactivas en matrices poliméricas biodegradables. De esta forma se combina la bioactividad de partículas inorgánicas con las propiedades de soporte de una matriz polimérica que actúa como andamio.

Los **bionanocompósitos** son una nueva clase de nanomateriales, tal que uno de sus componentes está comprendido en la escala nanométrica, las partículas bioactivas o el andamio. En comparación a los compósitos tradicionales, estos biomateriales ofrecen mayor área superficial, mayor reactividad superficial, unión entre las interfases relativamente fuerte, flexibilidad de diseño y propiedades mecánicas mejoradas (Murugan y cols., 2005). Estos materiales muestran a menudo un excelente balance entre resistencia mecánica y dureza, y usualmente características mejoradas comparado con sus componentes en forma individual (Tjong, 2006). Es de suma importancia mencionar que la matriz ósea natural es también un compósito, formado por una matriz orgánica (colágeno) y relleno inorgánico (apatita), y la ingeniería de tejidos intenta emular esto mediante la síntesis de diversos compósitos.

La incorporación de nanopartículas cerámicas a matrices poliméricas es una práctica que se está explorando últimamente, ya que estas otorgan bioactividad al compósito y por otra funciona como nanorelleno que produciría un efecto de reforzamiento mecánico del andamio. Específicamente, estudios recientes demuestran que la adición de partículas de nBG a andamios poliméricos permite la construcción de un bionanocompósito que combina las propiedades de soporte del andamio con la capacidad osteoinductiva y osteoconductor de las nanobiocerámicas mejorando la capacidad de mineralización de los andamios compósitos y aumentando la rigidez del material sin comprometer su resistencia mecánica (Ehrlich y cols., 2008; Rezwan y cols., 2006; Celhay, 2014).

En tesis previas perteneciente a este mismo proyecto de investigación, se sintetizaron estos bionanocompósitos a base de **nano-BG (nBG y n-MBG)** utilizando quitosano/gelatina (QG) (Cádiz, Covarrubias, 2015) como matriz polimérica natural y poliuretano biodegradable (PU) como matriz de polímero

sintético (Agüero, Covarrubias, 2015) (Fig. 4 y 5). Los bionanocompuestos de QG y n-MBG con ciertos contenidos de nBG demostraron capacidad para inducir la formación de apatita tipo-ósea *in vitro*, además presentaron adecuada citocompatibilidad y capacidad para inducir la diferenciación osteogénica de células madres de pulpas dentales. Sin embargo para conocer el efectivo potencial de estos materiales en la inducción osteogénica, se requieren realizar estudios *in vivo*, utilizando apropiados modelos animales, previo a futuros estudios clínicos y a su uso en seres humanos. Y este corresponde justamente al objetivo de esta investigación: comparar la capacidad de regeneración ósea *in vivo* de bionanocompuestos cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo respecto a la de los andamios puros y los controles positivos y negativos.



Fig. 4. Bionanocompuesto de nBG al 5% más QG, en forma de esponjas liofilizadas y su estructura interna porosa vista en microscopía electrónica de barrido (SEM). *Fuente: Cádiz M. (2016).*



Fig. 5. Bionanocompósito de nBG/PU y su estructura porosa interna vista en SEM. *Fuente: Agüero A. (2015).*

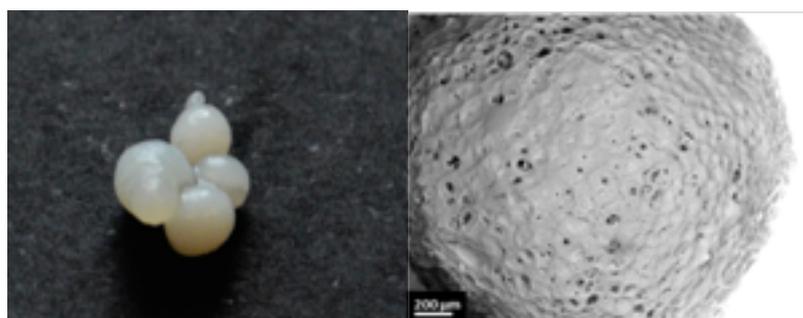


Fig. 6. a) Bionanocompósito de nBG/QG-SF. y su estructura porosa interna vista en SEM.

7. Modelo animal: estudios *in vivo*

Los modelos animales son herramientas indispensables en la investigación biomédica. Son utilizados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan a humanos y a animales, así también como el pronóstico de sus posibles tratamientos. Además son útiles en la docencia biológica, el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, y en la mayoría de los casos son insustituibles. Los genomas de muchos organismos modelos han sido secuenciados, y se ha descubierto que muchos genes se encuentran conservados entre los organismos modelos (animales o insectos) y el humano. (Hanqing, 2012; Hernández, 2006).

Los animales que se usan como modelos de estudio pueden ser conejos, ratones o ratas, entre estas, la cepa Sprague Dawley, que tiene como principal ventaja su tranquilidad y facilidad de manejo. El peso corporal de adultos es de 250 g a 300 g para las hembras, y 450 g a 520 g para los machos; su vida útil típica es 2,5 años a 3,5 años; y algunos de sus usos son en terapia genética,

diferenciación neuronal, estudios de deterioro de la memoria, actividad de neurotransmisores, respuesta al estrés traumático, cardiomiopatías (Laboratorio de ensayos biológicos LEBi, 2014), y recientemente se han demostrado se útiles para el estudio y evaluación de injertos óseos y de tejidos blandos con potencial uso en seres humanos. (Park, 2015; Bernabé, 2012). Sin embargo, de ser utilizados como modelos de estudio para injertos óseos se debe tener en consideración que existen dimensiones mínimas que debe cumplir el defecto óseo para que no cicatrice por sí solo en un tiempo determinado, pues de lo contrario no se podrían obtener diferencias con respecto a la regeneración del defecto óseo con injertos versus el defecto sin ningún injerto. Este concepto se conoce en la literatura científica como **tamaño crítico del defecto óseo** (critical size-bone defect) (Zhenyu, 2009). Este valor en ratas varía dependiendo de la zona en la cual se hará el defecto. En el fémur parte desde los 3 mm de diámetro, y se extiende con una profundidad que abarque al menos la cortical del hueso, de 2,5 mm aproximadamente (Zhou-Shan, 2015; Zhenyu, 2009).

Otro punto a tener en consideración cuando se trabaja con animales es su cuidado y manipulación de forma ética. En 1959 William Russell y Rex Burch, en Inglaterra, en su famoso libro “The principles of humane animal experimental techniques”, exponen por primera vez que la excelencia científica está fuertemente ligada al uso humanitario de los animales de laboratorio. Definen claramente las normas en las que se basan los principios éticos en la investigación con animales: las tres “Rs”: **Reducir, Reemplazar y Refinar**. Estos son los fundamentos para una racional e inteligente estrategia para minimizar el uso de animales y las causas de dolor y de estrés (Russell y cols., 1992; Goldberg y cols., 1996; Vanda-Cantón, 2003):

1. Los proyectos de investigación que requieren el uso de animales de laboratorio deben ser realizados con el número mínimo necesario de animales que permitan obtener resultados científicamente válidos.
2. Los procedimientos *in vivo* deben ser reemplazados siempre que sea posible por métodos alternativos que no usen animales vivos, como

modelos matemáticos, simulación por computador, test serológicos, cultivos celulares y sistemas biológicos *in vitro*.

3. El refinamiento involucra fundamentalmente la estandarización según parámetros internacionales: definición genético-sanitaria y la calidad del ambiente donde son criados y mantenidos los animales antes y durante la experimentación. Incluye todos los procedimientos para minimizar y eliminar el dolor, así como todos los métodos de enriquecimiento para asegurar el bienestar animal

Estos principios han sido adoptados para su aplicación a través de normas bioéticas, tales como la Declaración de la Asociación Médica Mundial Sobre el Uso de Animales en la investigación Biomédica, adoptada por la 41^a Asamblea Médica Mundial celebrada en Hong Kong, en 1989; la Guía del Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas para la investigación biomédica que involucre animales; las Guías para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos.

En el estudio llevado a cabo en este proyecto de tesis, se cumplen a cabalidad los principios éticos y de calidad de trabajos en modelos animales, y se encuentra autorizado por el “Comité de Bioética sobre Investigación en Animales” de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 1).

En vista de toda la información ya expuesta, y dado que a nuestro mejor conocimiento no se han encontrado trabajos ni investigaciones que involucren el estudio del comportamiento *in vivo* de bionanocompósitos de nBG y nMBG en matrices de QG y PU, el presente estudio tiene por objetivo evaluar la capacidad de regeneración ósea *in vivo* de bionanocompósitos cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo que ya fueron puestos a prueba *in vitro* en tesis anteriores.

HIPÓTESIS

Bionanocompósitos cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo presentan capacidad de regeneración ósea *in vivo* superior a la presentada por los andamios puros y por controles positivos y negativos.

OBJETIVOS

General

Comparar la capacidad de regeneración ósea *in vivo* de bionanocompósitos cargados con nanopartículas de vidrio bioactivo respecto a la de los andamios puros.

Específicos

- Evaluar y comparar mediante SEM-BS y microtomografía computarizada de rayos x la capacidad de regeneración ósea *in vivo* de bionanocompósitos con distinta estructura y composición utilizando un defecto femoral en rata.
- Comparar la capacidad de regeneración ósea *in vivo* de los distintos bionanocompósitos con la de un aloinjerto comercial de uso clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describen los materiales y métodos que fueron empleados para la realización de este estudio experimental *in vivo*.

1. Materiales

1.1. Bionanocompósitos

Los bionanocompósitos utilizados fueron preparados y evaluados *in vitro* en tesis anteriores del presente proyecto:

- Bionanocompósitos de quitosano/gelatina cargados con 5% de nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG/QG) y nanoesferas de vidrio bioactivo mesoporoso (nMBG/QG) (Cádiz, 2015). Estos bionanocompósitos se prepararon en la forma de esponjas porosas (nBG/QG-SP) y de esferas en estado gel (nBG/QG-SF). Como control se utilizó QG puro sin las nanopartículas.
- Bionanocompósitos de poliuretano biodegradable cargados con 5% de nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG/PU) y nanoesferas de vidrio bioactivo mesoporoso (nMBG/PU) (Agüero, 2015). Como control se utilizó PU puro sin las nanopartículas.
- Como referencia de material clínico y control positivo se usó el aloinjerto comercial Puros® Particulate Allograft (Zimmer Dental).
- Como control negativo, se se mantuvo el defecto óseo sin ningún injerto.

1.2. Implantación experimental *in vivo* y eutanasia

- Lidocaína tópica 2% (Xylocaína gel tópico, Astra Zeneca ®)
- Ketamina 100 mg solución inyectable (Ketostop, Dragpharma ®)
- Xilacina 100 mg solución inyectable (Xila-10, Dragpharma ®)

- Ketoprofeno 100 mg solución inyectable (Ket-10, Dragpharma ®)
- Povidona Yodada 10% (Difexon, Bago ®)
- Fresa Trefina de 3-4 mm de diámetro

1.3.Equipamiento

- Motor quirúrgico de baja velocidad 210W, 200-40000 RPM (NSK®)
- Motor de baja velocidad 12V 2 RPM, con modulador de velocidad
- Microscopio óptico Axioskop (Zeiss ®)
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) con retrodispersión de electrones (BS) y microanálisis EDX Jeol 6360 LV.
- Cortadora de precisión Isomet ® 1000 equipado con hoja diamantada Buehler ® 4" x 0,012" (100 x 0,3 mm)
- Cortadora de precisión SQW, modelo SYJ-150
- Micro - CT Bruker ® SkyScan 1278

2. Metodología

2.1. Experimento en modelo animal: implantación de los bionanocompuestos

Los biomateriales se evaluaron *in vivo* utilizando un protocolo de modelo animal, el cual se fue aprobado por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Protocolo CBA# 0542 FMUCH, Anexo 1). Todo el procedimiento fue realizado en un pabellón con las condiciones necesarias para realizar la la cirugía y estuvo regido de

acuerdo a protocolos del comité de bioética institucional, correspondiente a los cuidados antes, durante y después del procedimiento quirúrgico.

Se utilizaron en total 22 ratas macho, cepa Sprague Dawley, de 12 semanas de edad y 500 grs de peso promedio, fijando 1 injerto en cada rata. El sitio de implantación seleccionado fue la metáfisis proximal del fémur, tal como ha sido utilizada en experiencias anteriores (Diefenbeck et al., 2011; Vandamme et al., 2011).

La inducción de la anestesia y su mantención se realizó con ketamina (100 mg/Kg) más xilacina (13 mg/Kg) administrada por vía intraperitoneal y lidocaina de uso tópico (4%). Previo a la incisión de la piel con mango y hoja de bisturí, el pelaje sobre el fémur de la rata fue rasurado y la zona desinfectada con povidona yodada 10%. Posteriormente, y con ayuda de legras y decoladores, el tejido adyacente al hueso junto a los elementos nobles fueron decolados y aislados para evitar una hemorragia. La técnica de implantación del injerto consistió en realizar un defecto óseo, mediante una perforación con fresa quirúrgica trefina de 4 mm de diámetro en el sitio elegido de forma directa y con una profundidad de 2-3 mm (correspondiente al grosor promedio de la cortical ósea). El sitio de implantación fue irrigado con suero fisiológico durante la perforación, para propósitos de limpieza y refrigeración. Luego de forma manual mediante espátulas quirúrgicas se implantaron los diferentes biomateriales en los defectos óseos. Finalmente la herida fue suturada y aislada con un apósito, para evitar que el animal se muerda la zona intervenida.

Este método evita la realización de incisiones y colgajos más invasivos, disminuyendo el tiempo operatorio y mejorando el estado post-operatorio. La analgesia postquirúrgica fue administrada mediante una inyección intramuscular de ketoprofeno (9 mg/Kg) hasta el segundo o tercer día post-implantación, según sintomatología evidenciada en las ratas.

Las 22 ratas se mantuvieron en recuperación por un periodo de implantación de 9 semanas, que de acuerdo a otros estudios realizados con este tipo de modelos, es un tiempo adecuado que permite evaluar la regeneración del defecto óseo de las dimensiones utilizadas (Mattmann M. 2013). Durante este

período los animales fueron controlados diariamente en peso, actividad y estado de ánimo en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Terminado este período, los animales fueron eutanasiados, para la extracción de las muestras de tejido óseo. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando una cabina de eutanasia por CO₂. El procedimiento se encuentra resumido en la **Fig. 7**.

Las 22 ratas fueron distribuidas en 4 grupos dependiendo de la matriz a utilizar ordenadas como muestran las siguientes tablas:

Grupo I	Controles	Grupo II	Matriz de QG
M1	Control (+): Puros®	M5	QG-SP
M2	Control (+): Puros®	M6	QG-SP
M3	Control (-): Defecto óseo s/injerto	M7	nBG/QG-SP
M4	Control (-): Defecto óseo s/injerto	M8	nBG/QG-SP
		M9	nMBG/QG-SP
		M10	nMBG/QG-SP

Grupo III	Matriz de PU	Grupo IV	Matriz QG esferas
M11	PU	M17	QG-SF
M12	PU	M18	QG-SF
M13	nBG/PU	M19	nBG/QG-SF
M14	nBG/PU	M20	nBG/QG-SF
M15	nMBG/PU	M21	nMBG/QG-SF
M16	nMBG/PU	M22	nMBG/QG-SF

Cabe señalar que dos ratas M16 y M22 , fueron eutanasiadas por protocolos de bioética animal, debido a que presentaban fuerte dolor que no disminuía con los analgésicos.

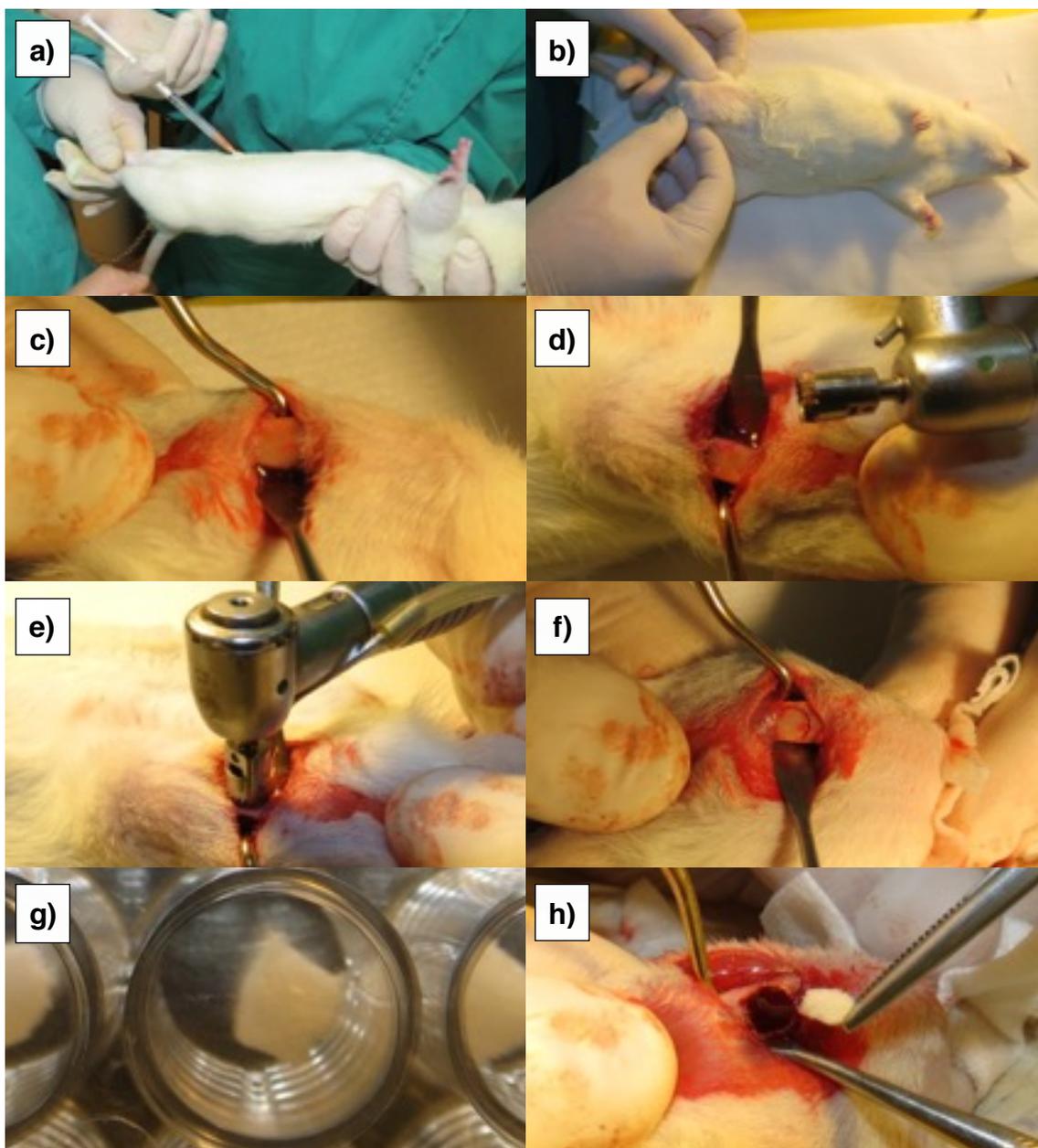


Fig 7. a) Anestesia con Ketamina/Xilacina. b) Preparación de la zona de incisión. c) Decolado de tejidos adyacentes al fémur de la rata. d) y e) Perforación con fresa trefina. f) Defecto óseo 4 mm de diámetro. g) Esponja de nBG/QG-SP previo a su inserción en sitio del defecto. h) Inserción de la esponja de nBG/QG-SP en la zona del defecto óseo.

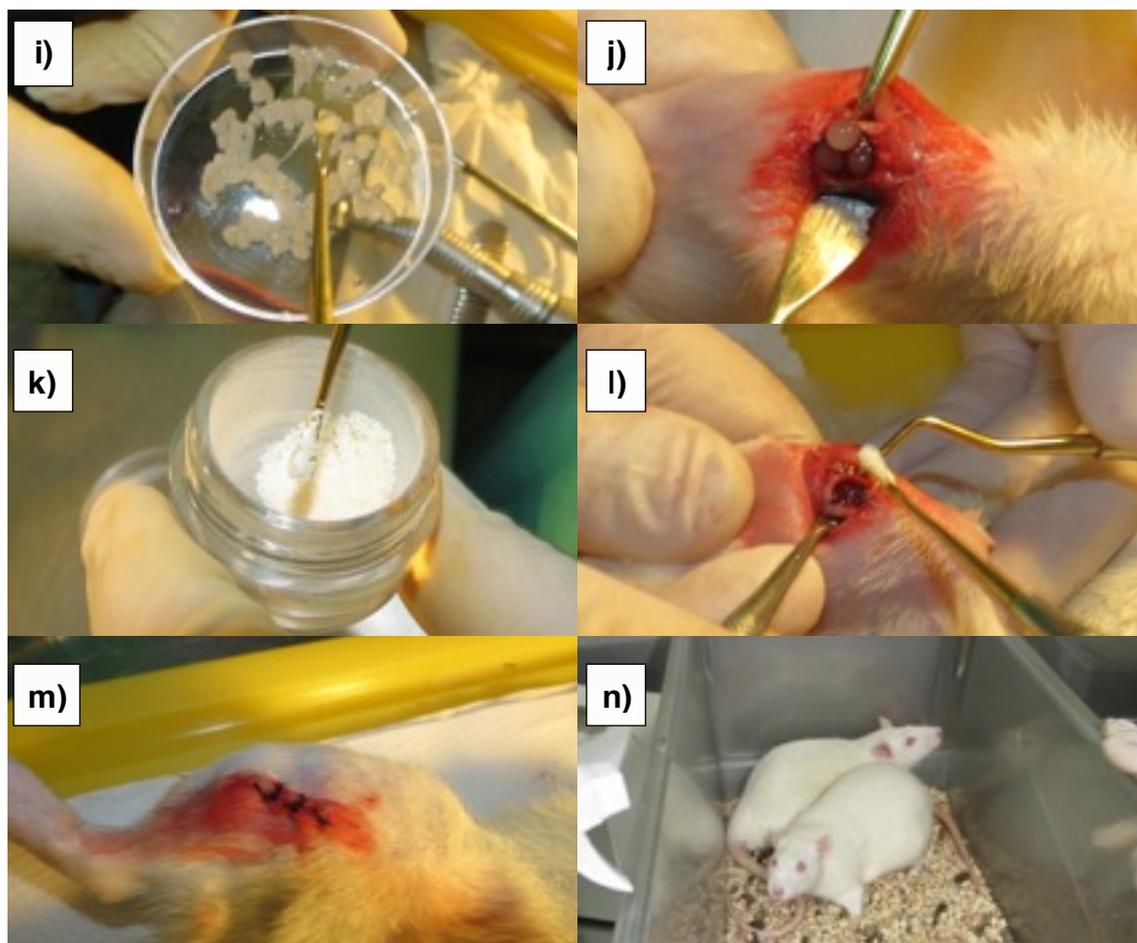


Fig. 7 continuación. i) Esferas de nBG/QG-SF previas a su inserción en el defecto óseo. j) Inserción de las esferas en el sitio del defecto. k) Puros® (hueso liofilizado de bovino) previo a su inserción en el defecto óseo. l) Inserción de Puros® en el sitio del defecto. m) Sutura con puntos simples. n) Ratas en sus jaulas posterior a la cirugía.

2.2. Procesamiento de las muestras

Para los análisis histológico y la microscopía electrónica de barrido de las muestras se utilizó un protocolo de inclusión de muestras óseas no descalcificadas en resina epóxica, análogo al protocolo de metil-metacrilato descrito por Peris J. L, 1993. Las muestras obtenidas fueron limpiadas del tejido blando adyacente, para obtener las muestras de tejido óseo con los scaffolds en estudio. Los tejidos obtenidos fueron fijados con formalina tamponada (10%) durante 48 horas, y deshidratados mediante concentraciones crecientes de alcohol (70%, 95%, 100%), manteniendo las muestras durante 1 hora en cada solución. La muestra luego fue secada al temperatura ambiente durante 10 min, para posteriormente realizar la infiltración de las muestras con

mezclas de acetona y resina epóxica. La proporción de acetona fue decreciendo (proporciones en volúmen acetona/Resina epóxica de 1:2, 1:5, 1:10 respectivamente, por una hora cada uno) hasta llegar a una solución pura de resina. Se esperó la polimerización hasta la formación de bloques plásticos transparentes de 1 cm de diámetro, que contuvieron las muestras de hueso con los injertos óseos en cuestión, orientadas de manera que se consiguieron cortes transversales del defecto y el hueso circundante.

Para el corte de los bloques en varias secciones, se utilizó una cortadora de precisión, equipada con una hoja diamantada de baja velocidad, refrigerada con agua. El grosor de los cortes fue de 200 μm , que es el mínimo grosor permitido por el equipo. Las muestras seccionadas pasaron por un baño de H_2O a 60-70 $^{\circ}\text{C}$ y luego fueron almacenadas en frascos de vidrio, ordenadas por tipo de muestra.

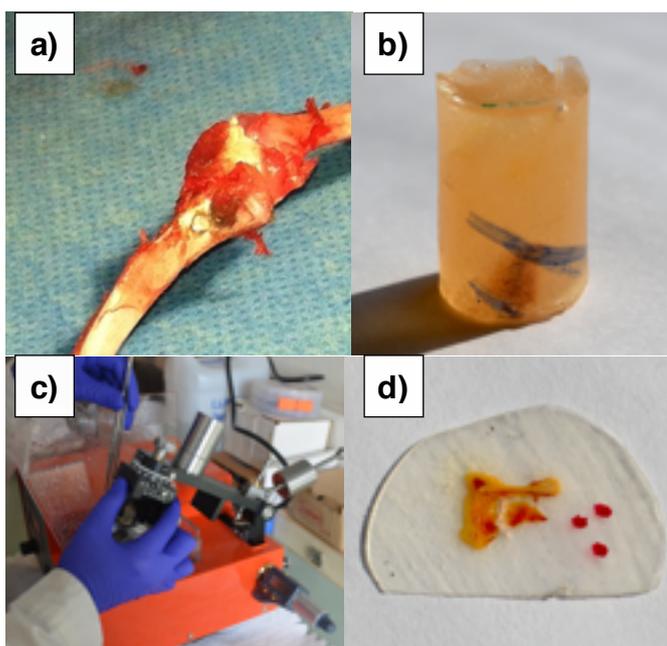


Fig. 8. a) Muestra del fémur de la rata obtenida posterior a su eutanasia. b) Fémur de rata con el defecto óseo inmersos en el soporte de MMA. c) Cortadora de precisión con disco de diamante. d) Muestra del defecto óseo ya cortada.

2.3. Análisis histológico convencional

Se seleccionaron muestras para histología convencional mediante microscopía óptica. Para este propósito los cortes fueron tratados con tinción hematoxilina/eosina, y otras con tinción tricrómica de Goldner modificada por Masson, la cual permite la diferenciación de tejido blando/fibroso, tejido osteoide y hueso maduro. Esta última tinción puede ser usada satisfactoriamente en huesos sin descalcificar, inmersos en metil metacrilato (MMA), glicol metacrilato y resina Spurr (Kylie y Yuehuei, 2003). La tinción ofrece además la ventaja de una buena tinción celular debido al componente de hematoxilina con discriminación aguda del tejido óseo maduro (que se tiñe de verde), el tejido óseo inmaduro o en neoformación (también conocida como tejido osteoide, que tiñe de rojo) y el cartílago calcificado (que se tiñe verde pálido). (Kylie y Yuehuei, 2003; Goldschlager, y cols., 2010).

La metodología de tinción utilizada se encuentra descrita en la página 334, tabla 4 del libro “Handbook of histology methods for bone and cartilage”, escrito y editado por Yuehuei H. An y Kylie L. Martin el 2003.

2.4. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Otro grupo de muestras fue seleccionado y observado mediante microscopía de barrido en modo retrodispersión de electrones (BSE-SEM) en conjunto con un análisis elemental mediante energía dispersiva de rayos X (EDX).

La microscopía SEM posee dos modalidades básicas de uso: haz de electrones de secundarios (SED) y electrones retrodispersados o backscattering (BS o BED-C). La primera permite corresponde a electrones de alta energía que se ven solo en alto vacío (1 micropascal) y entregan información precisa y detallada de la topografía de la muestra, y la segunda corresponde a electrones de baja energía que se reflejan producto del choque inelástico con los átomos de la muestra, que se ven en tanto en bajo como en alto vacío (de 650 a 30 pascales). La modalidad BED-C permite observar las muestras contrastando las zonas con mayor tejido mineralizado (partículas con

mayor peso atómico como metales) con las de menor contenido mineral (partículas de menor peso atómico): de color blanco el tejido mineralizado y de color negro o más oscuro el contenido orgánico no mineral (Vázquez y Echeverría, 2000).

De cada muestra se obtuvieron 3 imágenes SEM en modo de electrones retrodispersados (backscattering) a distintos aumentos: 15x para ver la macro estructura del hueso y los distintos grados de mineralización (espacio medular, cortical ósea interna, centro del defecto óseo y cortical ósea externa), 30x para realizar el EDX de la zona correspondiente al defecto óseo, y a 300x para ver la estructura interna del tejido óseo en neoformación.

2.5. Análisis de composición elemental por EDX

El análisis EDX indica la proporción y el porcentaje en peso de cada elemento químico presente en las muestras de tejido óseo. En este caso se marcaron los elementos de Carbono (C), Fósforo (P), Calcio (Ca) y Oxígeno (O) para el EDX, ya que son los elementos básicos que componen el tejido mineral, y permite realizar una comparación en contraste con el tejido orgánico no mineral. Para este proceso se demarcó el área correspondiente al área total del defecto óseo y se calcularon los porcentajes de cada uno de estos elementos. Además se calculó el porcentaje de Ca+P (%Ca+P) que conforma el área total del defecto óseo (un área aproximada de 4 mm de ancho por 2 mm de espesor, correspondiente con el tamaño crítico del defecto óseo), el cual se correlaciona con la cantidad de tejido óseo mineralizado dentro de este.

2.6. Histomorfometría básica de la histología y de SEM

Mediante un análisis histomorfométrico básico, se cuantificó la cantidad de tejido mineral que posee el área del defecto óseo. Los valores obtenidos corresponden al porcentaje de área de tejido mineralizado dentro del área total del defecto óseo o **porcentaje de hueso neoformado (%HNF)**, y se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$\%HNF = \frac{\text{Área hueso neoformado } (\mu\text{m})}{\text{Área total del defecto óseo}(\mu\text{m})} \times 100$$

Cabe destacar que tanto el %HNF como el %Ca+P obtenidos del EDX, se relacionan con la cantidad de tejido mineralizado, por lo cual son análisis complementarios para evaluación de la regeneración ósea.

Para el caso de las imágenes obtenidas por SEM a 30X, el área de tejido se midió utilizando las herramientas del programa Adobe® Photoshop CC 2017.

2.7. Análisis mediante microtomografía computarizada (Micro-CT) de rayos x

Las mismas muestras seleccionadas para realizar el análisis histológico convencional fueron sometidas a un análisis 3D mediante Micro - CT Bruker® SkyScan 1278, ubicado en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, para identificar las variaciones de densidad ósea generadas por los distintos materiales en las zonas del defecto óseo.

Las muestras fueron puestas en el porta muestras del equipo, y fueron sometidas al escaneo utilizando los valores de protocolo del software para ratas de la cepa Sprague Dawley (59 Kv de voltaje, intensidad de la corriente eléctrica de 537 uA, filtro de 1mm Al). Las imágenes fueron procesadas por el software interno del aparato (NRecon, 3D Data Viewer y 3D CTVox)

2.8. Análisis estadístico

Los valores cuantitativos obtenidos de la histomorfometría SEM-BS (%HNF), así como los datos del análisis de EDX (%CaP) fueron sometidos a análisis estadístico. Para comprobar la normalidad de la distribución de estos datos se aplicaron las pruebas estadísticas de Kolmogorow-SDmirnov y Shapiro Wilk, con el programa estadístico IBM SPSS, versión 21.0. Una vez comprobada la normalidad de los datos, se aplicaron el test de ANOVA one way y luego la test de comparación múltiple de Von Ferronni. Se utilizó un nivel de significancia de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Histología convencional y microscopía óptica

Debido a que los resultados de las muestras para histología convencional con microscopía óptica no fueron satisfactorios, este análisis histológico convencional se reemplazó por análisis de microtomografía computarizada de rayos - X (Micro-CT), equipo recientemente adquirido en la Facultad de Odontología. Además los tejidos fueron analizados mediante microscopía SEM/EDX en modo de electrones retrodispersados (BS) como estaba contemplado inicialmente en este trabajo de tesis.

Las muestras preparadas para histología convencional no fueron óptimas ya que el espesor ideal del espécimen para realizar análisis histológico en microscopio de óptico debe ser de 5 micrómetros (Gómez y Campos, 2009), mientras que el espesor mínimo que permite obtener la cortadora de precisión Isomet® 1000, es de 200 micrómetros. Además para la inclusión del tejido óseo se utilizó una resina epóxica, encontrándose que este polímero no se logró remover completamente, por lo cual interfería con las tinciones determinadas para realizar estos análisis (hematoxilina/eosina y tinción tricrómica de Masson modificada por Goldner)(Anexo 2).

2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la **Fig. 9** se presenta el análisis SEM-BS con aumento 15X del control de defecto óseo sin tratamiento y del resto de los defectos óseos tratados con los diferentes biomateriales. Las zonas claras/blancas de las imágenes representan el tejido mineral, mientras que las zonas más oscuras representan tejido blando no mineralizado. Los resultados muestran que luego de las 6 semanas de implantación no se produce una reparación del defecto óseo control, mientras que en el resto de los biomateriales generaron un cierre del defecto óseo, con tejido óseo neoformado en distintos grados de densidad. La matriz que mostró mayor densidad mineral fue la de Quitosano/Gelatina (QG), tanto en forma de esferas como esponja liofilizada. Entre las nanobiocerámicas nBG y nMBG, en las dos matrices (QG y PU) tanto en esponja como en esferas, la que generó una mayor densidad mineral fue nBG.

En particular el **control negativo de defecto óseo sin tratamiento** (Fig. 9 b) presentó una discontinuidad de la cortical ósea correspondiente a la zona del defecto óseo. La muestra de **Puros®** (Fig. 9 a) mantiene la continuidad de la cortical del lado del defecto óseo, sin embargo éstas se encuentran adelgazadas respecto del resto de las corticales de la muestra. Además muestra distintos grados de densidad, evidenciado por la apariencia moteada o porosa de las corticales del defecto óseo.

En el **grupo de andamios de esponja de QG (QG-SP)**, se puede apreciar que el andamio puro sin nBG (Fig. 9 c) presenta continuidad de la cortical ósea externa del lado del defecto, sin embargo la porción central del defecto, entre la zona medular del hueso y la cortical externa, tiene baja densidad mineral que se evidencia en el centro oscuro, característico de tejidos más blandos en el SEM en modalidad de electrones retrodispersados (BS). La muestra de nBG/QG-SP (Fig. 9 d) mantiene una cortical externa continua en la zona del defecto óseo, y la porción central del defecto se encuentra mayormente mineralizada, con un aspecto moteado pero denso, sobretodo en la muestra 8 (nBG/QG-SP). Las corticales internas se encuentran mantenidas y no invaden el espacio medular. La muestra 9 de nMBG/QG-SP (Fig. 9 e) posee una cortical externa continua en la zona del defecto, un centro hiperdenso bien mineralizado, pero en general la zona cortical de un espesor menor al resto de las corticales del fémur del animal.

En el **grupo con matrices de PU** (Fig. 9 f, g y h), las imágenes fueron en general similares y características: corticales óseas externas discontinuas y abombadas, sobrepasando el límite del área total del defecto óseo; el centro del defecto con un aspecto trabeculado de densidad mixta; y una cortical interna discontinua que invade el espacio medular. La muestra de nBG/PU (Fig. 9 g), es la única de todo el grupo III que presenta corticales tanto externa como interna continuas y sin invadir el espacio medular.

Por último en el **grupo IV de esferas de QG (QG-SF)**, el andamio puro de esferas (Fig. 9 i) sin nanopartículas, muestra una cortical externa continua, un centro de aspecto moteado de densidad mixta y una cortical interna discontinua pero que no invade el espacio medular. El grosor de las corticales es similar al

del resto de las corticales del hueso, de aproximadamente 2 mm. La muestra de nBG/QG-SF (Fig. 9 j) presenta una cortical externa continua, una zona central con un espacio hipodenso y una cortical interna continua, gruesa, mineralizada y que no invade el espacio medular. La muestra de nMBG/QG-SF (Fig. 9 k) tiene una cortical externa continua, un centro moteado de densidad mixta y una cortical interna discontinua, pero que no invade el espacio medular.

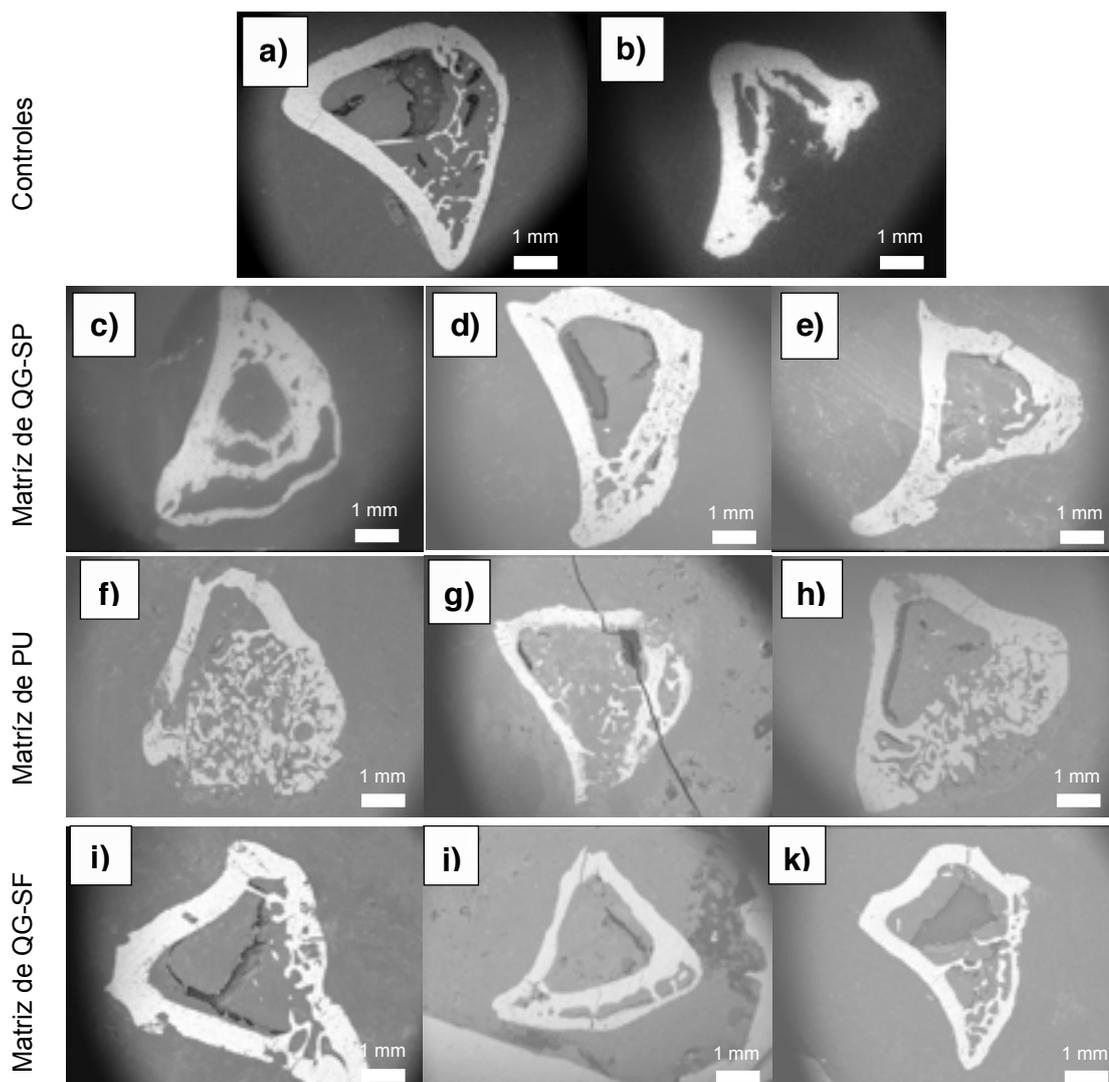


Fig. 9. SEM con aumento 15X: a) Puros®. b) Control del defecto óseo sin biomaterial. c) QG-SP. d) nBG/QG-SP. e) nMBG/QG-SP. f) PU. g) nBG/PU. h) nMBG/PU. i) QG-SF. j) nBG/QG-SF. k) nMBG/QG-SF.

La **Fig. 10** muestra a mayor resolución (250X) la microestructura del tejido reparado en la zona del defecto óseo. Se puede apreciar que en todos los andamios de QG con nBG y nMBG el hueso neoformado fue de alta densidad

mineral, a diferencia de los andamios de PU, en el cual la matriz no fue reabsorbida en su totalidad.

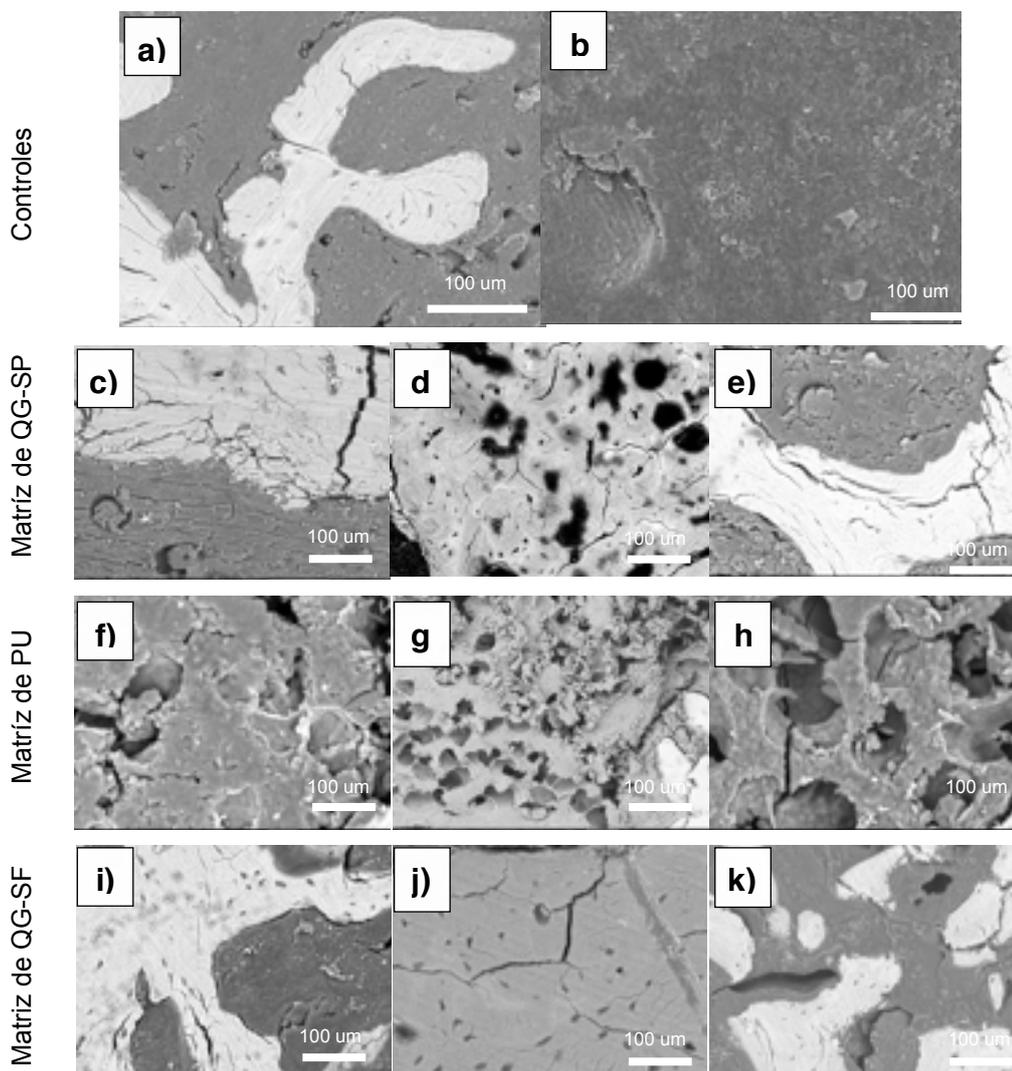


Fig. 10. SEM con aumento 250X: a) Puros®. b) Defecto óseo sin tratamiento. c) QG-SP. d) nBG/QG-SP. e) nMBG/QG-SP. f) PU. g) nBG/PU. h) nMBG/PU). i) QG-SF. j) nBG/QG-SF. k) nMBG/QG-SF.

3. Análisis de composición elemental mediante EDX

Las áreas totales del defecto óseo en SEM 30X, el mapeo elemental de Ca y sus respectivos espectros de composición elemental obtenidos por EDX se presentan en la **Fig. 11**. En las imágenes SEM 30X, en la primera columna de la Fig. 11, se encuentra demarcada el área total del defecto óseo para cada muestra, marcando en su interior en color rojo el área correspondiente a calcio (Ca), en azul el fósforo (P) y en amarillo el carbono (C). En la columna central

se muestran las imágenes particulares de mapeo de Ca del área total del defecto óseo, con lo que se puede demostrar que el color blanco o más claro que se aprecia mediante la modalidad backscattering (SEM-BS) es en efecto tejido mineral. En la tercera columna se muestran los espectros de composición elemental de Ca, P, y C.

El promedio de los valores de %Ca+P en %p/p obtenidos en cada tipo de muestra se resumen en el gráfico de la **Fig. 12**. Las barras en color negro corresponden a los controles positivo (Puros®) y negativo (defecto sin tratamiento). Los bionanocompósitos que tuvieron valores de %Ca+P similares al control negativo, es decir que no poseen diferencias estadísticamente significativas corresponden a: **PU** (Fig. 11 f), **nBG/PU** (Fig. 11 g). Los bionanocompósitos que obtuvieron valores marcadamente más altos que el control positivo o gold standard (Puros®) fueron: **nBG/QG-SP** (Fig.11 d), **QG-SF** (Fig. 11 i) y **nBG/QG-SF** (Fig.11 j). Por último las muestras que no mostraron diferencias significativas con el Puros® fueron: **QG-SP** (Fig 11 c), **nMBG/QG-SP** (Fig. 11 e) y **nMBG/QG-SF** (Fig.11 k).

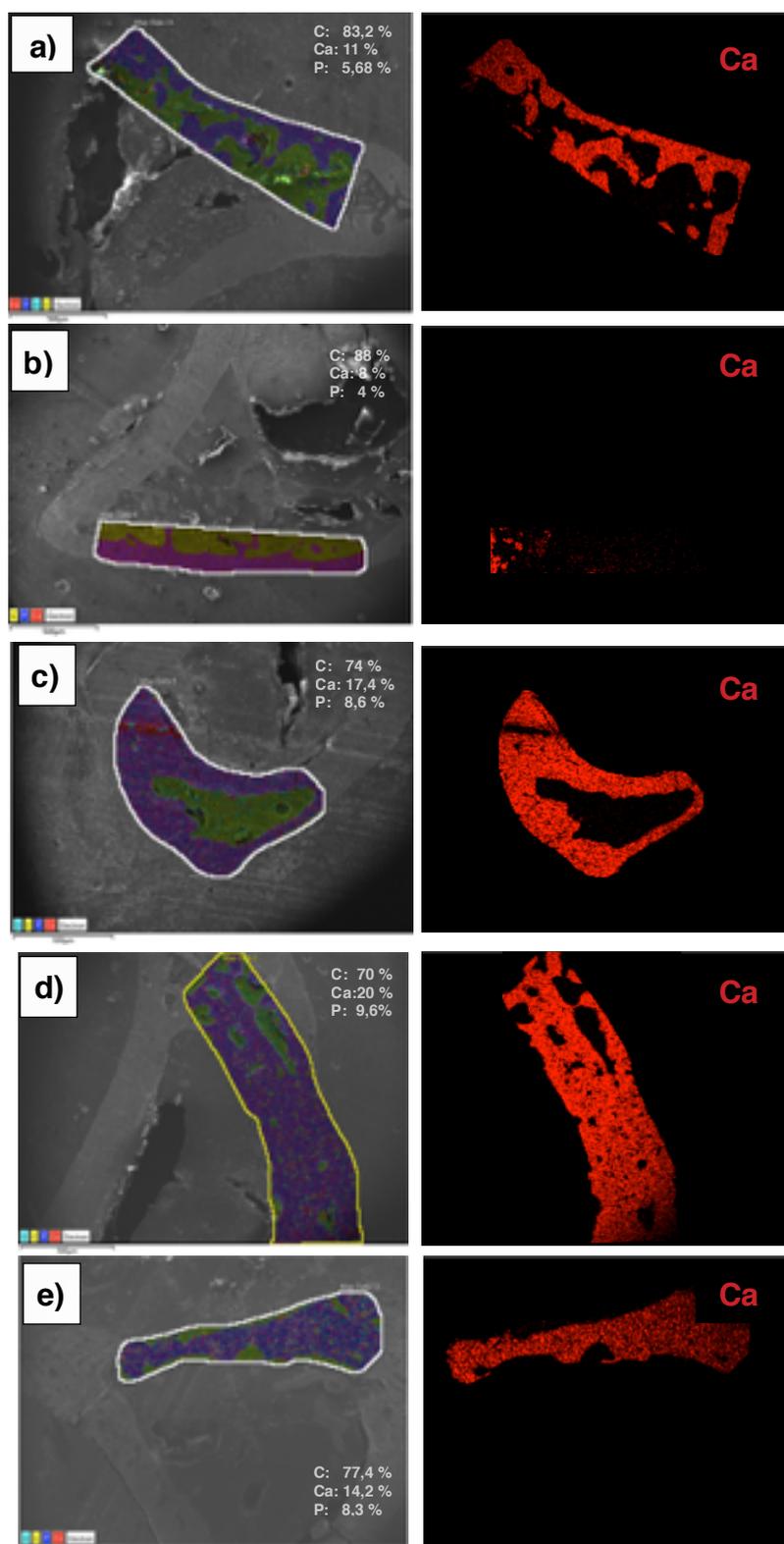


Fig. 11. Mapeo elemental y espectro EDX de tejido neoformado por a) Puros®. b) Control del defecto sin biomaterial. c) QG-SP. d) nBG/QG-SP. e) nMBG/QG-SP

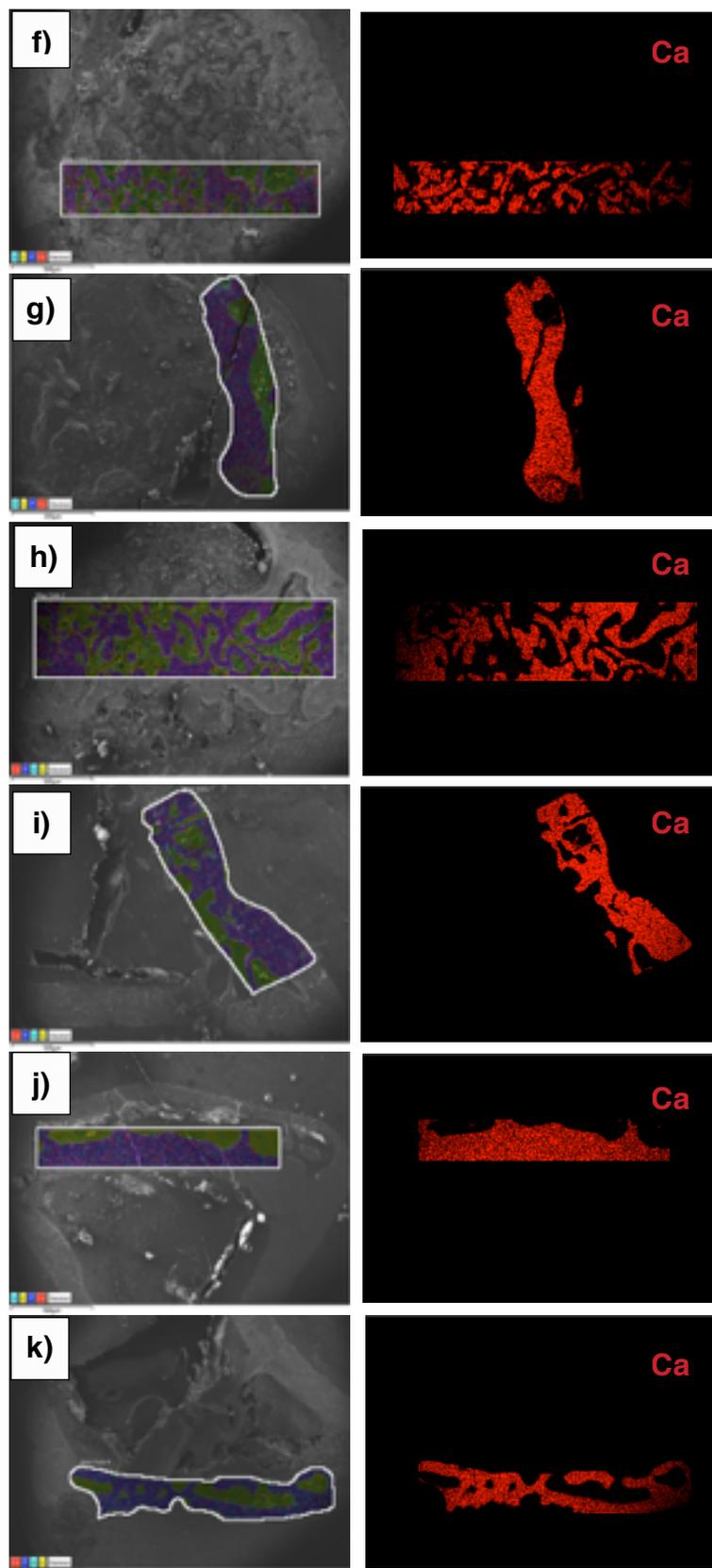


Fig. 11. Continuación de Mapeo elemental y espectro EDX: Mapeo elemental y espectro EDX: f) PU. g) nBG/PU. h) nMBG/PU. i) QG-SF. j) nBG/QG-SF. k) nMBG/QG-SF.

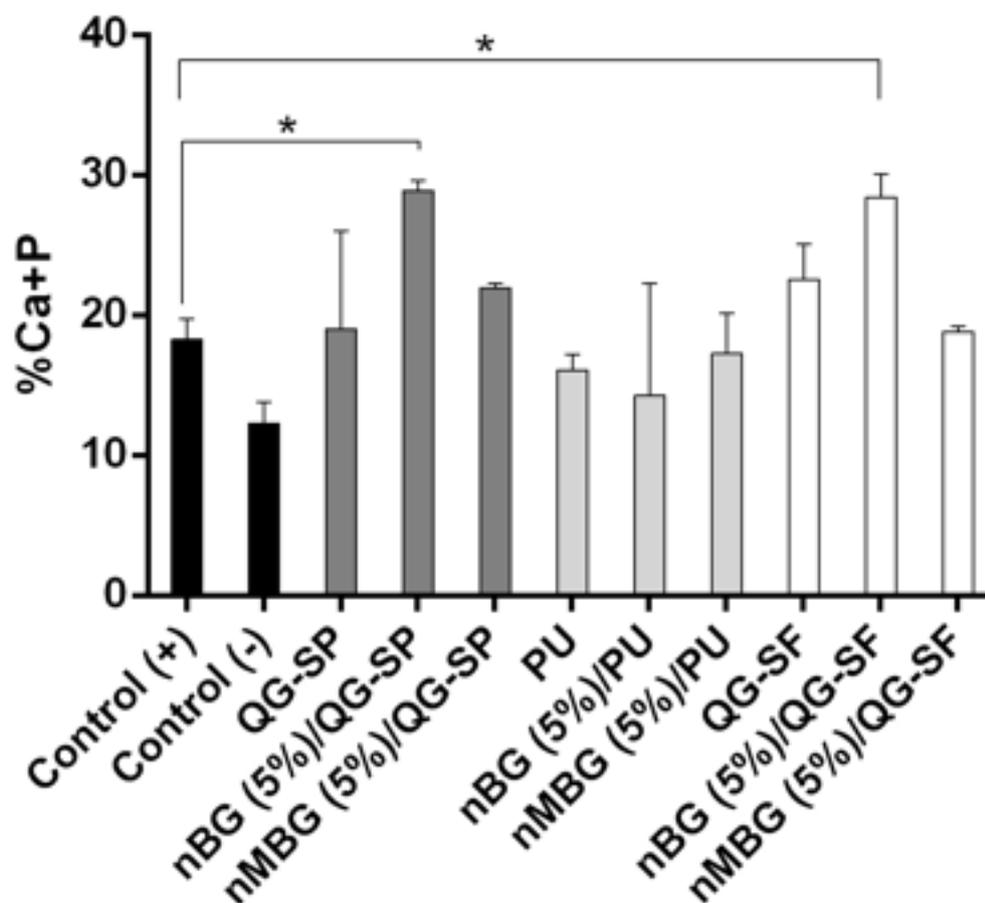


Fig. 12. Contenidos de de %Ca + P de tejidos de hueso neoformado por cada bionanocompósito y los controles. Los * destacan las principales muestras que poseen diferencias estadísticamente significativas.

4. Histomorfometría de las imágenes SEM 30x

El gráfico de la **Fig. 13** resume los valores de %HNF obtenidos mediante el análisis histomorfométrico básico más su correspondiente desviación estándar, en las imágenes obtenidas por SEM con aumento 30X. Los controles, tanto positivo como negativo, se encuentran destacados en la barra de color negro. Los bionanocompósitos que presentaron mayor %HNF y que presentan diferencias significativas con el control negativo del defecto sin tratamiento corresponden a: **QG-SP, nBG/QG-SP, nMBG/QG-SP, QG-SF y nBG/QG-SF**. Las muestras que presentaron %HNF similares o más bajos que le control negativo, es decir, que no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el

mismo fueron el **andamio puro de PU y nMBG/PU**. El resto de las muestra, marcadas en negrita, presentaron valores similares al control positivo con Puros®. Entre los materiales estudiados el %HNF aumentó en el siguiente orden: PU, nBG/PU, nMBG/PU < QG-SP, QG-SF, nMBG/QG-SP, nMBG/QG-SF < nBG/QG-SP, nBG/QG-SF.

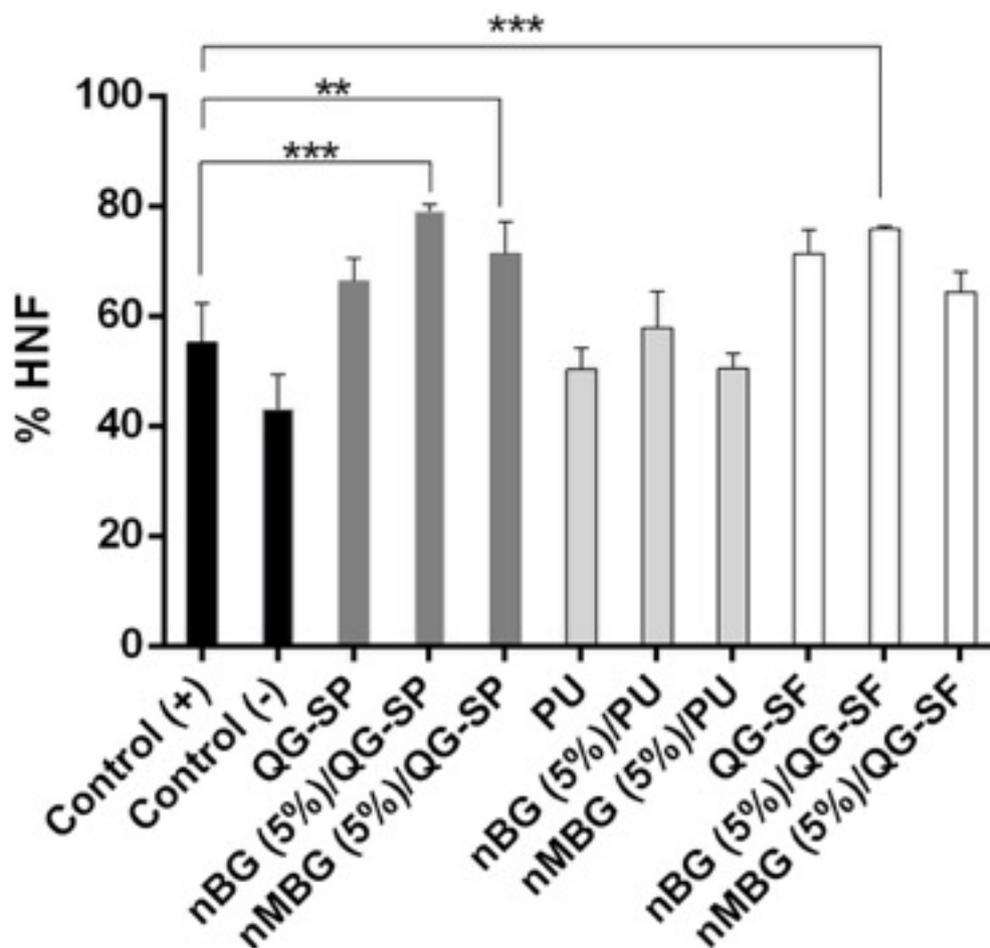


Fig. 13 %HNF producido por los distintos bionanocompósitos y los controles. Los * destacan las principales muestras que poseen diferencias estadísticamente significativas.

5. Análisis mediante Microtomografía computarizada (Micro - CT)

Las reconstrucciones 3D obtenidas mediante el Micro-CT Bruker® se presentan en la Fig. 14. En todas las imágenes obtenidas, el defecto óseo se encuentra delimitado por una línea punteada roja para facilitar la comparación.

El defecto óseo sin tratamiento o control negativo (Fig. 14 b) evidencia claramente la zona del defecto óseo, debido a que no existe cortical que delimite el contorno del hueso. El tejido óseo formado por Puros® o control positivo (Fig. 14 a) posee ambas corticales bien delimitadas, pero claramente adelgazadas respecto al resto de las corticales del mismo hueso.

El **QG-SP** sin nanopartículas (Fig. 14 c) genera un tejido óseo que presenta en la zona del defecto óseo una cortical externa e interna bien delimitada, de espesor disminuido respecto al resto de las corticales. Se aprecian también entre las corticales externa e interna un trabeculado óseo poroso. La muestra de nBG/QG-SP (Fig. 14 d), forma un tejido con corticales tanto interna como externa bien limitada, bien corticalizadas y de espesor similar al resto de las corticales. El centro del defecto óseo es de aspecto trabeculado. nMBG/QG-SP (Fig. 14 e) generó un hueso con una cortical continua pero muy adelgazada. El **grupo de bionanocompósitos con matriz de PU** formaron un hueso con una imagen común en todas las muestras, corticales externas abombadas, mal delimitadas, centros trabeculados de densidades variables, más densos en la muestra pura de PU (Fig. 14 f) y corticales internas mal delimitadas que invaden el espacio medular. La muestra de nBG/PU (Fig. 14 g), en particular presentan menos invasión del espacio medular que el resto de las muestras de su grupo. nMBG/PU (Fig. 14 h) tiene una imagen similar a la de nBG/PU, pero con menor densidad mineral.

Por último el **grupo con matrices de esferas QG-SF**, presenta imágenes diversas. Las esferas puras sin nanopartículas (Fig. 14 i) muestran corticales interna y externa bien delimitadas, de espesor similar al resto de las corticales del mismo hueso, no invade el espacio medular y está levemente trabeculado. nBG/QG-SF presenta en la zona del defecto óseo corticales de espesor similar al resto de las corticales, bien delimitadas y con centro levemente trabeculado, sin invadir el espacio medular. Por último, nMBG/QG-SF también presenta corticales interna y externa bien delimitadas, delgadas pero de espesor similar al resto de las corticales del mismo hueso.

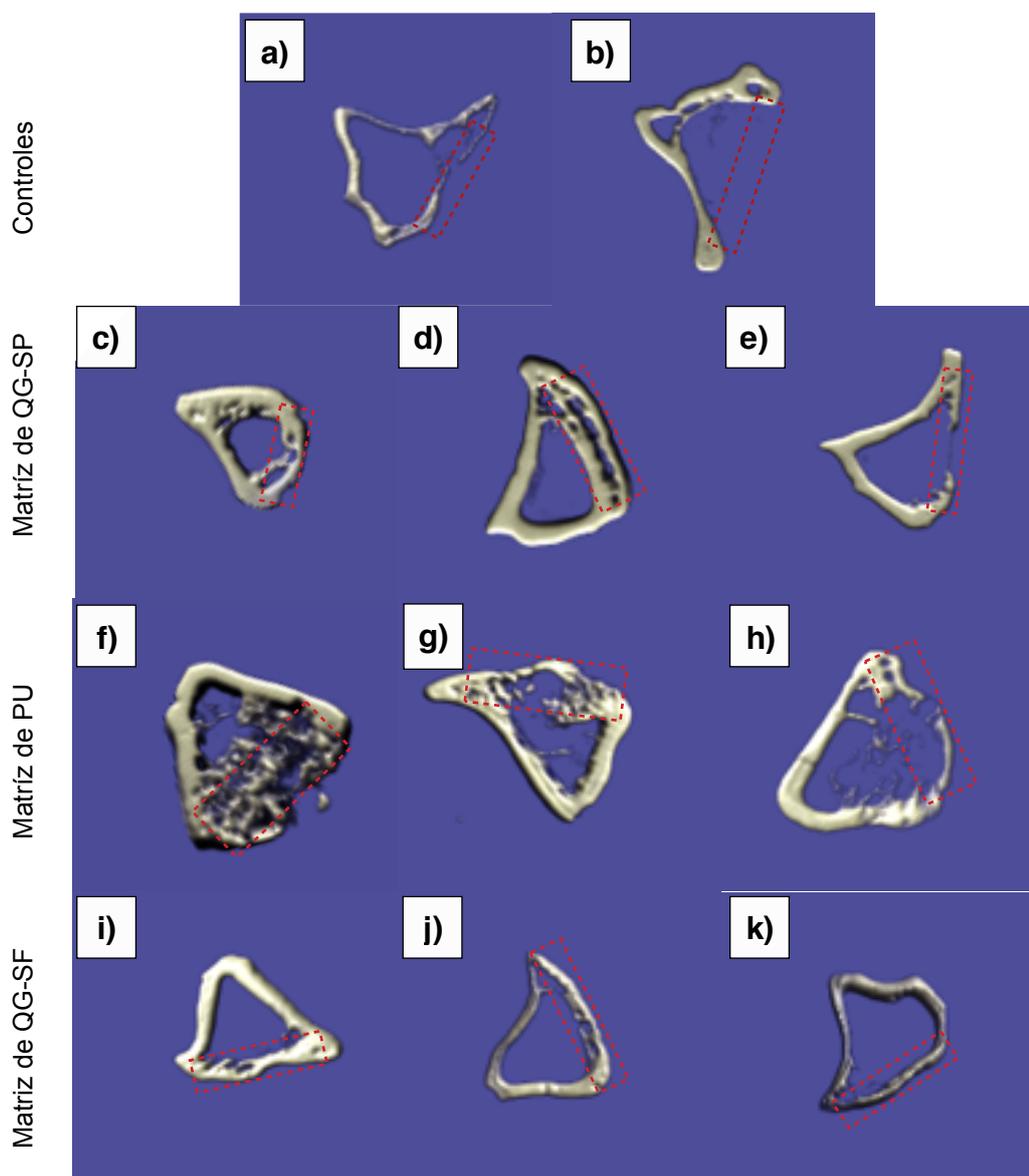


Fig. 14. Microtomografía computarizada (Micro-CT): a) Puros®. b) Control del defecto óseo sin biomaterial. c) QG-SP. d) nBG/QG-SP. e) nMBG/QG-SP. f) Andamio puro de PU. g) nBG/PU. h) nMBG/PU. i) QG-SF. j) nBG/QG-SF. k) nMBG/QG-SF.

DISCUSIÓN

Del análisis comparativo entre las características de los tejidos óseos neoformados con los distintos bionanocompósitos y los respectivos controles se encontraron diferencias mediante las distintas técnicas utilizadas.

En primer lugar, el control negativo se correlaciona con la teoría respecto al tamaño crítico del defecto óseo (Zhenyu, 2009), puesto que mediante ambos métodos de análisis se comprobó que el defecto no presentó capacidad para autorepararse.

En general los biomateriales evaluados en este estudio, la mayoría presentó capacidad para producir un tejido óseo nuevo, y algunos de ellos presentaron capacidades superiores al Puros® (control positivo). De los dos tipos de andamios analizados, aquellos a base de QG presentaron una mejor capacidad de formar tejido óseo que PU. Esta diferencia se debe a la mayor biodegradabilidad de QG por sobre el PU, ya que los QG ha demostrado *in vitro* que tienen grupos funcionales (amino, carboxílicos), que estimulan la diferenciación de células madre en osteoblastos (Covarrubias, 2015), característica que no posee el PU. Esto explica también por qué los andamios puros también generan mineralización del tejido neoformado (Cádiz, 2015).

Se encontró en general que los materiales cargados con nBG y nMBG presentaron mayor bioactividad que los andamios puros, lo cual es de esperar dado las propiedades osteoinductivas de estas nanopartículas ya reportadas en la literatura (Maiorana, y cols., 2006; Daculsi y cols., 1989; Suvorova y cols., 1998). Además estos resultados se corresponden positivamente con los resultados obtenidos *in vitro* en trabajos anteriores de este mismo proyecto (Cádiz, 2015). Comparando andamios cargados con ambas nanopartículas, aquellos que contenían nBG presentaron mejores resultados en términos de densidad mineral y cantidad de hueso formado (%HNF y %Ca+P) que nMBG. Esto se explica porque el nBG (70 nm) al tener un menor tamaño de partículas que nMBG (100 nm), posee una mayor tasa de disolución en iones que inducen la cristalización de apatita, mientras que la difusión de los iones liberados por nMBG está limitado por los canales nanoporosos, lo que reduce la tasa de

cristalización de la capa de apatita en relación con la formada por nBG que no posee este impedimento de su difusión iónica (Ca^{+2} , PO_4^{-3}). Además es conocido que algunos de los iones liberados por el BG (silicio) son responsables de estimular un mecanismo genético de diferenciación celular (Xynos y cols., 2000; Hattar y cols., 2005), el cual consiste en una mayor expresión del gen Runx2 y la enzima ALP, los cuales se consideran marcadores tempranos del proceso de diferenciación osteogénica de las células madre, que se expresan cuando los osteoblastos depositan la matriz extracelular del hueso (Komori, 2000; Komori, 2002).

Otro punto a destacar es que los compósitos cargados con nanobiocerámicas presentaron mejores resultados que el aloinjerto comercial Puros®. Esto se debe a la naturaleza del Puros® que es hueso compuesto de cristales termodinámicamente estables de hidroxapatita, los cuales no liberan elementos que estimulen los mecanismos celulares de regeneración de tejido, es decir solo poseen propiedades osteoconductoras, mientras que nBG posee además capacidad osteoinductora por los productos de disolución que libera, como se indicó anteriormente.

Con respecto a los biomateriales a base de PU hay que destacar que a pesar de que indujeron la formación de nuevo tejido óseo, resulta fundamental complementar la información obtenida mediante la histomorfometría y EDX con el análisis SEM-BS, debido a que las muestras con matrices de PU poseen una desventaja en relación al resto de los compósitos en estudio, y es que la matriz, pese a ser biodegradable, se reabsorbe a una velocidad inferior a lo que lo hacen las matrices naturales de QG (Agüero, 2015). Esto se comprueba con el abombamiento de las corticales y expansión del PU visualizado en todas las muestras de PU ya sea con o sin nanopartículas, además de la microestructura aún visible en SEM de los poros del poliuretano. Estas dos características en conjunto dificultan la adecuada consolidación y remodelación del hueso neoformado en el área del defecto, produciendo una calcificación ectópica de la matriz, disminuyendo así la densidad mineral en el área total del defecto. Esta característica podría eventualmente limitar el uso del PU en estudios clínicos. Sin embargo, es necesario realizar estudios con tiempos mayores de incubación para confirmar la degradabilidad *in vivo* de este polímero.

Por otro lado respecto a las técnicas utilizadas para el análisis histológico (SEM y Micro-CT), ambas presentan una utilidad similar pero con ciertas diferencias. El primero en la modalidad de BS recoge información de la superficie de la muestra, generando de esta forma una imagen bidimensional de contraste de fase. Esto genera una imagen mucho más precisa, detallada y a mejor resolución tanto de la composición como de la topografía de la muestra (Vázquez y Echeverría, 2000). La microtomografía computarizada en cambio genera una imagen tridimensional del espesor total de la muestra, aunque con una menor resolución que SEM-BS, pero que permite evaluar el volumen óseo total de la muestra y no solo su superficie. Lo anterior indicaría que en el caso de una imagen SEM-BS podría tratarse solo de una capa mineralizada y no un tejido óseo como tal. De esta forma las técnicas de SEM-BS y Micro-CT entregan información complementaria para una más completa comprensión de la estructura del tejido formado.

Por último, respecto a la forma de presentación de los biomateriales, tanto las esponjas (QG-SP) como las esferas (QG-SF) presentaron resultados superiores a Puros® en forma de polvo, sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, al momento de llevar a cabo el procedimiento quirúrgico, las esferas resultaron ser más cómodas para su implantación en el sitio del defecto, debido a su consistencia y a su flexibilidad que le permite amoldarse al defecto óseo. Cabe mencionar que tanto las esponjas como las esferas demostraron en estudios previos poseer características (módulo de elasticidad) adecuadas para soportar cargas biomecánicas en especial aquellas a base de PU (Cádiz, 2016; Amaru, 2015). Además el polímero actúa como un andamio que posee la tridimensionalidad necesaria para la reconstrucción del tejido. Esta es una característica importante que en general los materiales presentados en forma de polvo no cumplen, lo cual constituye una ventaja versus Puros®.

En resumen la hipótesis planteada al inicio de este trabajo se cumple, debido a que el bionanocompósito compuesto por una matriz polimérica natural de QG y nBG, constituye un biomaterial que genera mayor formación de tejido óseo que

los andamios puros, y en algunos casos también que el aloinjerto comercial Puros®.

Las propiedades osteogénicas presentados por los biomateriales nBG/QG-SF y nBG/QG-SP los hacen adecuados para ser evaluados en seres humanos en distintas cirugías como elevación de seno maxilar, aumento de reborde residual, relleno de defectos óseo o tumores extirpados, etc. las principales ventajas clínicas de estos biomateriales podrían ser la disminución de los tiempos requeridos para la reconstrucción ósea, formando al mismo tiempo un hueso de mejor calidad. Además con respecto al procedimiento quirúrgico, las ventajas serían el fácil manejo y la mejor adaptación a los límites del defecto óseo de los bionanocompósitos en forma de esferas, el menor riesgo de morbilidad en el paciente comparado a los autoinjertos (hemorragias, infecciones y pérdida de otras zonas óseas) (Bons y cols., 2002) y la menor respuesta antigénica debido a la elevada biocompatibilidad tanto de los polímeros naturales (Shi y cols., 2006) como del nBG.

CONCLUSIONES

- Todos los bionanocompósitos con nanopartículas de vidrio bioactivo fueron capaces de inducir reparación de los defectos óseos en modelo animal en ratas, y algunos de ellos (nBG/QG-SP y nBG/QG-SF) presentaron mayor bioactividad que el aloinjerto comercial Puros®.
- Los materiales a base de polímero natural de quitosano/gelatina (QG) indujeron mayor formación de hueso mineralizado que el polímero sintético de poliuretano biodegradable (PU), en sus dos formas de presentación, esferas y esponjas; probablemente debido a la mayor biodegradabilidad y presencia de grupos funcionales del polímero natural.
- Los biomateriales preparados con la nanopartícula nBG en su estructura presentaron mayor capacidad de regeneración ósea *in vivo* que aquellos a base de nMBG, confirmado las propiedades superiores ya demostradas *in vitro* por nBG.
- Considerando que algunos materiales (nBG/QG-SP) presentaron capacidades superiores que el aloinjerto comercial Puros®, resultan atractivos para su futura evaluación mediante estudios clínicos; con el propósito de desarrollar biomateriales más avanzados para reparación ósea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaru Agüero (2015). Preparación y evaluación in vitro de materiales para regeneración ósea basados en poliuretano biodegradable y nanopartículas biocerámicas. Tesis para optar al título profesional de Cirujano Dentista, Universidad de Chile.

Alperin C, Zandstra PW, Woodhouse KA. (2005) Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005;26: 7377.

Alcaide M, Portoles P, Lopez-Noriega A, Arcos D, Vallet-Regi M, Portoles MT (2010). Interaction of an ordered mesoporous bioactive glass with osteoblasts, fibroblasts and lymphocytes, demonstrating its biocompatibility as a potential bone graft material. *Acta Biomaterialia* 6, 892–899.

Bernabé PFE, Melo LGN, Cintra LTA, Gomes-Filho JE, Dezan E Jr, Nagata MJH. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin. Oral Impl. Res.* 23, 2012;384–388 doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02166.x

Buser D.(2009). 20 years of guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Pub. Co.

Betts N, Fonseca R. Allogenic grafting of dentoalveolar clefts. *Oral Maxillofac Clinic North* 1991;3(3): 122.

Barbour S. A. The Safe And Effective Use Of Allograft Tissue—An Update. *Am J Sports Med* 2003; 31: 791-7.

Bons N, Lehmann S, Mestre-Francès N, Dormont D, Brown P. (2002). Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*. *Transfusion*, 42(5), 513–516.

Buck BE, Malinin TI, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop Relat Res* 1989; 240: 129-36.

Calvo, Rafael, Figueroa, David, Díaz-Ledezma, Claudio, Vaisman, Alex, & Figueroa, Francisco. (2011). Aloinjertos óseos y la función del banco de huesos. *Revista médica de Chile*, 139(5), 660-666. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000500015>

Cristian Covarrubias, Fabiola Arroyo, Consuelo Balanda, et al., "The Effect of the Nanoscale Structure of Nanobioceramics on Their In Vitro Bioactivity and Cell Differentiation Properties," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2015, Article ID 526230, 14 pages, 2015. doi:10.1155/2015/526230

Daculsi G, LeGeros R, Mitre D. (1989). Crystal dissolution of biological and ceramic apatites. *Calcified Tissue International*, 45(2), 95–103.

Degidi M, Piattelli A, Carinci F. (2007). Immediate loaded dental implants: comparison between fixtures inserted in postextractive and healed bone sites. *Journal of Craniofacial Surgery*; 18(4):965-71.

Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.; 2000. p. 1-14.

Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV, Coulthard P. Intervenciones para el reemplazo de piezas dentarias faltantes: técnicas de aumento óseo para el tratamiento con implantes dentales (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2007 Número 3. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The CochraneLibrary*, 2007 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.). (<http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v20n3/original2.pdf>)

Espinosa V. Los aloinjertos óseos en cirugía ortopédica y Traumatológica. *Patología del Aparato Locomotor* 2004; 2: 263-87

Emmanuel Morelli (2015). Evaluación de la citocompatibilidad y capacidad de diferenciación osteogénica de células madre de pulpa dental cultivadas en andamios basados en poliuretano biodegradable y nanopartículas de vidrio bioactivo. Tesis para optar al título profesional de Cirujano Dentista, Universidad de Chile.

Ehrlich H, Janussen D, Simon P, Bazhenov V, Shapkin N, Erler C, Vournakis, J. (2008). Nanostructural Organization of Naturally Occurring Composites. Part II: Silica-Chitin-Based Biocomposites. *Journal of Nanomaterials*, 2008.

Goldberg A, Zurlo J, Rudacille D. The three Rs and biomedical research. *Science* 1996; 272: 1403.

Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications *J Am Acad Orthoped Surg* 1995;3:1-8

Gazdag A, Lane J, Glaser D, Forster R. Alternatives To Autogenous Bone Graft. *J Am Acad Orthop Surg* 1995; 3: 1-8.

Goldschlager T., Abdelkader A., Kerr J., Boundy I., Jenkin G. (2010). Undecalcified Bone Preparation for Histology, Histomorphometry and Fluorochrome Analysis. *JoVE*. 35. <http://www.jove.com/details.php?id=1707>, doi: 10.3791/1707)

Griffith L.(2002). Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, 83–95.

Griffith L. (2000). Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 48, 263–77.

Gil Pilonieta A; J. Franklin; L.J. Cruz Riaño, Poliuretanos degradables a partir de aceite de higuera, *Sci Tech*. XIII(36),1–6, 2007

Gogolewski, S (1989). Selected topics in biomedical polyurethanes. A review.. *Colloid Polym Sci* 267 (9): 757–785

Guelcher S., Gallagher K.M., Didier J.E.; Klinedinst D.B. ; Docto J.S.; . Goldstein A.S., et al. (2005) Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders, *Acta Biomater.* 1, 471–484, 2005.

Guan JJ., Sacks MS., Beckman EJ., Wagner WR. Synthesis, (2002) characterization and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane) ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. *J Biomed Mater Res* 2002;61:493.

Grageda, E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and standardized research protocol. *Implant Dent*, 13:301-9, 2004.

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25, 1813–1827.

Hong Z, Reis R, Mano J. (2009). Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 88(2), 304–313.(2010).

Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally S. (2005). In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(36), 7616–7627.

Hanqing Xie. *Ratones y ratas de laboratorio*. Synatom Research. Estados Unidos, New Jersey. 2012. Disponible en <http://www.labome.es/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>.

Herms J. Romij N, Miller PD Jr. An Improved Immunocytochemical Staining Method for Large Semi-thin Plastic Epon Sections: Application to GABA in Rat Cerebral Cortex. *Periodontal plastic surgery. Curr Opin Periodontol* 1993:136–143.

Hattar S., Asselin A., Greenspan D., Oboeuf M., Berdal A., and Sautier J.-M., "Potential of biomimetic surfaces to promote in vitro osteoblast-like cell differentiation," *Biomaterials*, vol. 26, no. 8, pp. 839–848, 2005.

Jones EA, Yang XB. (2005). Mesenchymal stem cells and their future in bone repair. *Int J Adv Rheumatol*. 3(3):15–21.

Jayakumar R, Prabakaran M, Nair SV, Tamura H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnol Adv*; 28(1):142-50.

Komori T., "A fundamental transcription factor for bone and cartilage," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 276, no. 3, pp. 813–816, 2000.

Komori T., "Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 87, no. 1, pp. 1–8, 2002.

Keshaw H, Forbes A, Day RM. (2005). Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials*, 26(19):4171-9.

Kaigler D, Mooney D. (2001). Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of Dental Education*, 65(5), 456–462.

Krishnan V, Lakshmi T.(2013). Bioglass: A novel biocompatible innovation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 4:78-83.

Lim EH, Sardinha JP, Myers S. (2014). Nanotechnology biomimetic cartilage regenerative scaffolds. *Arch Plast Surg*, 41(3):231-40.

Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi). Costa Rica. 2014. Sprague Dawley. Disponible en: <http://lebi.ucr.ac.cr/index.php/es/2-uncategorised/5-sprague-dawley>.

María Elsa Gómez de Ferraris, Antonio Campos Muñoz. 3ª Edición. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. Ed. Médica Panamericana. 2009. Pág.17.

Maiorana C, Sigurtà D, Mirandola A, Garlini G, Santoro F. Sinus elevation with alloplasts or xenogenic materials and implants: an up-to-4-year clinical and radiologic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(3): 426-32.

Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão F, Cooper L. (2008). Advancing dental implant surface technology from micron to nanotopography. *Biomaterials*, 29(28), 3822–3835.

Murugan R, Ramakrishna S. (2005). Development of nanocomposites for bone grafting. *Comput Sci Technol*, (65), 2385–2406.

Mao, Jin Shu; Zhao, Li Guo; Yin, Yu Jin and Yao, Kang De (2003). Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds. *Biomaterials*, vol. 24, no. 6, p. 1067-1074.

Monserrat Cádiz (2016). Optimización de la preparación de andamios bionanocompósitos para regeneración ósea basados en biopolímeros y nanopartículas biocerámicas. Tesis para optar al título profesional de Cirujano Dentista, Universidad de Chile. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/141797>

Mattmann Matías (2013). Evaluación in vivo de la oseointegración de implantes dentales modificados con recubrimientos bioactivos nanoestructurados, usando un modelo de rata. Tesis para optar al título profesional de Cirujano Dentista, Universidad de Chile.

Ministerio de Salud. (2010). Diagnóstico de situación de salud bucal Chile 2010: análisis de situación salud bucal. Chile.

Monzón Trujillo Dayron, Martínez Brito Isabel, Rodríguez Sarduy René, Piña Rodríguez José Jorge, Pérez Mír Elizabeth Aurora. Injertos óseos en

implantología oral. Rev. Med. Electrón. [Internet]. 2014 Ago [citado 2018 Ene 04]; 36 (4): 449-461. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242014000400007&lng=es.

nibib.nih.gov [Internet]. Estados Unidos. 2013. Disponible en: <https://www.nibib.nih.gov/espanol/temas-cientificos/ingenier%C3%ADa-de-tejidos-y-medicina-regenerativa-0>

Nayar S, Bhuminathan S, Muthuvignesh J. (2011). Upsurge of Nanotechnology in Dentistry and Dental Implants. Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry, 1(5), 264–268.

Oliveira AAR, de Carvalho SM, de Fatima Leite M, Orefice RL, Pereira MM. (2012). Development of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles scaffolds for bone tissue engineering applications. J Biomed Mater Res Part B 2012;100B:1387–1396.

Park, K.-W., Yun, Y.-P., Kim, S. E., & Song, H.-R. (2015). The Effect of Alendronate Loaded Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds on Bone Regeneration in a Rat Tibial Defect Model. International Journal of Molecular Sciences, 16(11), 26738–26753. <http://doi.org/10.3390/ijms161125982>

Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., & Ramirez-Vick, J. E. (2014). Scaffold Design for Bone Regeneration. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 14(1), 15–56.

Roether JA, Gough JE, Boccaccini AR, Hench LL, Maquet V, Jérôme R. (2002). Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering. J Mater Sci Mater Med. 13(12): 1207-1.

Robbins SL . Cotran RS. Patología estructural y funcional. 2ª ed. México: Interamericana; 1998.

Rezwana K, Chena QZ, Blakera JJ, Boccaccinia AR. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Rev Biomaterials*. 27: 3413-3431.

Richard M. Day (2005), Ph. D. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue engineering* volume 11, number 5/6.

Russell W, Burch R. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen, 1992.

Rabkin E, Schoen F. (2002). Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 11(6), 305–317.

Rodríguez J, Ríos S, González M. (2002). Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(1), 92–100.

Ryszkowska, J.L., Auguścik, M., Sheikh, A., Boccaccini, A.R., (2010) Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass® for bone tissue engineering, *Composites Science and Technology*

Sowmya S, Sudheesh Kumar P, Chennazhi K, Nair S, Tamura H, Jayakumar R. (2011). Biocompatible β -chitin Hydrogel/Nanobioactive Glass Ceramic Nanocomposite Scaffolds for Periodontal Bone Regeneration. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 25(1), 1–11.

Spaans C J, Belgraver VW, Rienstra O, Groot JH, Veth RP. (2000) Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. *Biomaterials* 2000;21:2453

Suvorova E, Christensson F, Lundager Madsen H, Chernov A. (1998). Terrestrial and space-grown HAP and OCP crystals: effect of growth conditions on perfection and morphology. *Journal of Crystal Growth*, 186(1-2), 262–274.

Selvam P, Bhatia SK, Sonwane CG (2001). Recent advances in processing and characterization of periodic mesoporous MCM-41 silicate molecular sieves. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 40(15): 3237–3261.

Sanosh, K.P., Chu, M., Balakrishnan, A., Lee, Y., Kim, T.N., Cho, S. (2009). Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle. *Current Applied Physics*, 9: 1459–1462.

Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. (2003). Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23: 313–323.

Shi, Chunmeng; Zhu, Ying; Ran, Xinze; Wang, Meng; Su, Yongping, Cheng, Tianmin. (2006). Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research*, vol. 133, no. 2, p. 185-192.

Sukumar S, Drízhal I. (2008). Bone grafts in periodontal therapy. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 51(4):203-7.

Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:543-552.

Sàndor G, Lindholm T , Clokie C. (2003). Bone regeneration of the Cranio-maxilofacial and Dento-alveolar Skeletons in the Framework of Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering*, University of Oulu, Chapter 7, 1– 46.

Saska S, Souza Mendes L, Minarelli Gaspar A.M, Sidorenko de Oliveira Capote T. (2015). Bone Substitute Materials in Implant Dentistry, *Current Concepts in Dental Implantology*, Associate Prof. Ilser Turkyilmaz , editor. ISBN: 978-953-51-1741-4, InTech.

Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone

tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 1–4.

Silvia Hernández. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *BIOMEDICINA*, 2006, 2 (3) - 252-256 ISSN: 1510-9747.

Tjong SC. (2006). Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 53(3–4), 73–197.

Tortolini P., Rubio S.. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Avances en Periodoncia* [Internet]. 2012 Dic [citado 2018 Ene 04]; 24(3): 133-138. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852012000300003&lng=es.

Vázquez Gerardo, Echeverría Olga. 1ª Edición. *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. Ed. UNAM. 2000. Págs.

Valenzuela F, Covarrubias C, Martínez C, Smith P, Díaz-Dosque M, Yazdani-Pedram M. (2012). Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 100(6), 1672–1682.

Vanda-Cantón B. La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. *Lab Acta* 2003;15: 69-73.

Vallet-Regí M (2010). Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. *Journal of Internal Medicine*, Volume 267, Issue 1, pages 22–43.

Wu C, Fan W, Chang J (2013). Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells. *J Mater Chem B* 1: 2710–2718.

Wu, Chengtie, and Jiang Chang. (2015). Mesoporous Bioactive Glasses: Structure Characteristics, Drug/growth Factor Delivery and Bone Regeneration

Whang PG, Wang JC. Bone graft substitutes for spinal fusion. *Spine J* 2003;3:155-165.

Wu X, Liu Y, Li X, Wen P, Zhang Y, Long Y, Gao J. (2010). Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 1167–1177.

Xynos D., M. V. J. Hukkanen, J. J. Batten, L. D. Buttery, L. L. Hench, and J. M. Polak, "Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering," *Calcified Tissue International*, vol. 67, no. 4, pp. 321–329, 2000.

Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos A. (2005). Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 109(1-3), 256–274.

Yuehwei H. An, Kylie L. Martin. 1^a Edición. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Totowa, New Jersey. Humana Press Inc. 2003.

Zhenyu Zhao, Daping Yang, Xu Ma, Hongmei Zhao, Chunlei Nie and Zhenxing Si Successful Repair of a Critical-Sized Bone Defect in the Rat Femur with a Newly Developed External Fixator. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2009, 219, 115-1N20
ovel External Device for Bone Healing Research 115

Zhou-Shan Tao, Qiang Zhou, Kai-kai Tu, Zheng-liang Huang, Hongming Xu, Tao Sun, Yang-Xun Lv and Wei Cui. Treatment study of distal femur for parathyroid hormone (1–34) and b-tricalcium phosphate on bone formation in critical size defects in rats. *Journal of Biomaterials Applications* 0(0) 1–8. The Author(s) 2015

ANEXOS

Anexo 1: Certificación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITE DE BIOETICA SOBRE
INVESTIGACION EN ANIMALES

CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *"Síntesis y evaluación de nanocompositos bioactivos basados en nanopartículas cerámicas y polímeros para ingeniería tisular ósea en odontología"* cuyo investigador responsable es el **Dr. Cristian Covarrubias G.**, no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA# 0542 FMUCH).

El Dr. Covarrubias se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto enviado al concurso FONDECYT 2013

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO" después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.


Dr. Carlos Valenzuela Y.
Presidente

Santiago, 3 de Septiembre de 2012.

Anexo 2: Histología convencional y microscopía óptica

Las imágenes de microscopía óptica fueron obtenidas con ayuda y asesoría del Prof. Cristian Peñafiel, académico del área de histología de la facultad de odontología de la universidad de Chile y Rocío Orellana, tecnóloga médica encargada de SEM de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

La tinción utilizada corresponde a la Tricrómica de Goldner-Masson para diferenciar tejido óseo maduro de tejido osteoide.

En la siguiente figura se aprecian las imágenes obtenidas, y se aprecia que el hueso cortical en ciertas imágenes posee color verde oscuro, y en otras rojo, no permitiendo estandarizar el color por tipo de tejido. De todas formas estos ensayos constituyen un avance para el análisis de tejidos óseo mineralizados, ya que no existían antecedentes respecto al preparado histológico de este tipo de muestra y con este tipo de tinción.

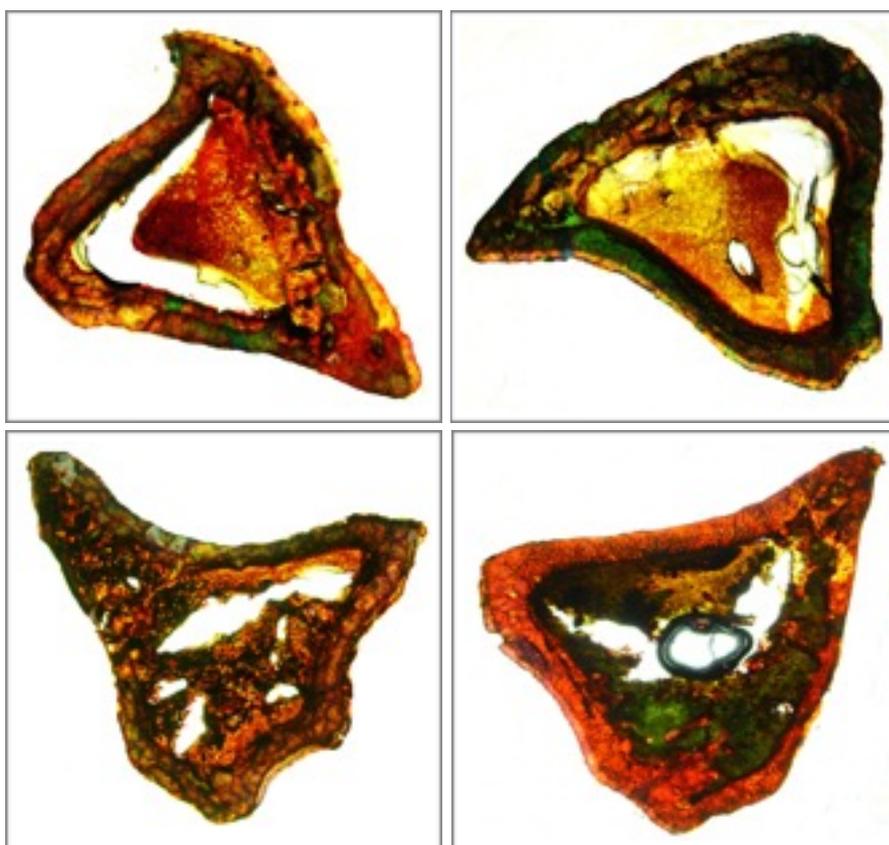


Fig. 15. Histología mediante Tinción tricrómica de Goldner Masson. a) nBG/QG-SF. b) Puros®. c) nMBG/QG-SF. d) QG-SF