



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA.
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.
FACULTAD DE MEDICINA.
POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS
FUNDAMENTALES

**EFICIENCIA DEL LIPOSOMA A BASE DE
QUITOSANO PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA
GUIADA EN RATAS WISTAR.**

www.bdigital.ula.ve

Autora:
Od. Dubraska Suárez
Tutor: Dr. Carlos García.

Mérida – Venezuela. 2012



**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA.
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.
FACULTAD DE MEDICINA.
POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS
FUNDAMENTALES**

**EFICIENCIA DEL LIPOSOMA A BASE DE
QUITOSANO PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA
GUIADA EN RATAS WISTAR.**

Trabajo Especial de Grado como requisito parcial para optar al título de Magíster en Ciencias Médicas Fundamentales.

Mérida – Venezuela. 2012

ÍNDICE GENERAL.

Apartado.	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. El Problema.....	3
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1. Objetivo General.....	6
1.2.2. Objetivos Específicos.....	6
1.3. Justificación.....	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Antecedentes.....	10
2.2. Fundamentos Teórico-Conceptuales.....	18
Breve historia de la regeneración ósea guiada.....	20
Biología ósea.....	21
Proceso de regeneración ósea.....	23
Fases del remodelado óseo.....	26
Mecanismo de acción de la ROG.....	29
Indicaciones y contraindicaciones de la ROG.....	36
Principios quirúrgicos generales de la técnica en odontología.....	37
Condiciones imprescindibles para lograr el éxito tras la aplicación de una	

ROG.....	38
Quitina y Quitosano.....	42
Tratamiento químico para la obtención del Quitosano.....	45
Caracterización físicoquímica del quitosano en relación a sus propiedades biológicas.....	47
Liposoma y membrana de quitosano.....	53
Principales usos biomédicos del quitosano.....	57
Usos del quitosano en odontología.....	65
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	70
Tipo y Diseño de Investigación.....	70
Muestra.....	71
Sistema de Variables.....	71
Técnica de recolección de datos.....	77
Instrumentos de recolección de datos.....	77
Aspectos Bioéticos sobre la experimentación en animales.....	77
Material, Instrumental y Equipos.....	79
Procedimientos.....	82
Metodología estadística.....	90
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
Hallazgos radiográficos cualitativos.....	92
Hallazgos radiográficos cuantitativos.....	100
Hallazgos histológicos cuantitativos.....	107
Evaluación histológica cuantitativa.....	117
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	129
Conclusiones.....	129
Recomendaciones.....	130
ANEXOS.....	131
ANEXO A. Ficha de observación para evaluar la evolución clínica del animal.....	131
ANEXO B. Ficha de observación para evaluar la eficiencia del quitosano en la	

regeneración ósea guiada	133
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura	Pág.
Figura 1. Estructura del hueso.....	22
Figura 2. Fases del remodelado óseo.....	28
Figura 3. Etapas biológicas que sigue la cicatrización de la interfase hueso- membrana o biomaterial para la ROG	29
Figura 4. Procedimiento para aplicar la regeneración ósea guiada en herida alveolar.....	30
Figura 5. Esquema de la función mecánica del andamio biodegradable hasta la regeneración ósea	35
Figura 6. Numeración de los carbonos y numeración beta en la molécula de glucosa.....	43
Figura 7. Estructura química de la Celulosa.....	43
Figura 8. Estructura química de la Quitina.....	43
Figura 9. Unidad repetitiva del Quitosano.....	44
Figura 10. Diagrama resumen del proceso de obtención del quitosano.....	46
Figura 11. Biogel de quitosano obtenido por disolución en ácido acético...	48
Figura 12. Adhesión y proliferación celular en biopelículas de quitosano y en otro polímero.....	54
Figura 13. Microfotografía electrónica de barrido de andamio de quitosano...	55
Figura 14. Representación de un sistema liposomal estabilizado por deposición electrostática y la metodología empleada para preparar los sistemas estabilizados con quitosano	56

Figura 15. Visualización por microscopía electrónica de transmisión de la morfología de nanovesículas liposomales recubiertas con biopolímero quitosano.....	57
Figura 16. Efecto hemostático inmediato de una herida alveolar postexodoncia al contacto con membrana de quitosano.....	61
Figura 17. Algunos productos del quitosano de uso cosmeceútico disponibles en el mercado.....	64
Figura 18. Radiografía de una hemimandíbula de rata y escala de aluminio	73
Figura 19. Medición del defecto óseo en radiografía de referencia.....	74
Figura 20. Obtención del porcentaje de ROG de los defectos óseos	75
Figura21. Pasos de preparación del animal para la experiencia quirúrgica.....	83
Figura22. Anestesia, incisión, abordaje, realización del defecto e implantación del liposoma de quitosano dentro del mismo.....	84
Figura23. Sutura de planos muscular y epitelial.....	85
Figura24. Disección y conservación de las tibias.....	86
Figura25. Inclusión en parafina.....	87
Figura26. Corte de la parafina y desparafinado	88
Figura27. Batería de coloración de las muestras.....	89
Figura28. Montaje de los preparados histológicos.....	89
Figura29. Distribución de los especímenes y sus tiempos de sacrificio.....	91
Figura 30. Imágenes típicas de cada nivel de mineralización del defecto.....	94
Figura 31. Comportamiento histológico observado en el grupo experimental. Semana 3.Corte histológico (HE) de tibia experimental con indicadores sugerentes de regeneración ósea.....	107
Figura 32. Comportamiento histológico observado en el grupo experimental. Semana 3.....	108
Figura 33. Comportamiento histológico observado en el grupo control. semana 3.....	110

Figura 34. Comportamiento histológico observado en el grupo control durante la semana 6.	112
Figura 35. Comportamiento histológico observado en el grupo experimental. Semana 6.	113
Figura 36. Imagen característica de la madurez ósea en el grupo experimental. Semana 6.....	114
Figura 37. Comportamiento histológico observado en el grupo control. Semana 9.....	115
Figura 38. Comportamiento histológico observado en el grupo experimental. Semana 9.....	116
Figura 39. Corte histológico (HE) de tibia control de Wistar. Aumento de 20x. Semana 9.....	116
Gráfico 1a. Radiopacidad del área intervenida en cada evaluación.....	93
Gráfico 1b. Frecuencia acumulada de la radiopacidad del área intervenida.....	93
Gráfico 2a. Cantidad y extensión de la aposición mineral en ambos grupos, para la semana 3, 6 y 9 postquirúrgica.....	95
Gráfico 2b. Cantidad y extensión promedio de la aposición mineral al final del estudio.....	96
Gráfico 3a. Continuidad del defecto con el área circundante en cada evaluación.....	98
Gráfico 3b. Promedio continuidad del defecto con el área circundante.....	98
Gráfico 4. Promedio de Reducción de los defectos en cada evaluación para ambos grupos de estudio.....	101
Gráfico 5. Extensión de la regeneración ósea.....	102
Gráfico 6a. Grado histológico de madurez ósea.....	117
Gráfico 6b. Promedio de Madurez ósea a lo largo del estudio.....	118

Gráfico 7a. Calidad de la médula ósea para cada momento evaluado.....	121
Gráfico 7b. Calidad de la Médula ósea en ambos grupos.....	122
Gráfico 8a. Nivel de continuidad del defecto con el hueso circundante para cada evaluación.....	123
Gráfico 8b. Continuidad del defecto óseo con el hueso circundante.....	124
Gráfico 9a. Formación ósea desde los márgenes del defecto.....	125
Gráfico 9b. Formación ósea periférica. Frecuencia global.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Células óseas.....	23
Tabla 2. Procesos implicados en la neoformación ósea.....	24
Tabla 3. Clasificación de los biomateriales para ROG.....	32
Tabla 4. Requerimientos en el diseño y elección de un andamio para regeneración ósea guiada.....	34
Tabla 5. Resumen de las aplicaciones odontológicas del quitosano.....	69
Tabla 6. Estadísticos de muestras relacionadas.....	103
Tabla 7. Prueba T. Diferencia acumulada de medias muestras relacionadas entre grupos al final del estudio.....	103
Tabla 8. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (prueba no paramétrica de diferencia de medias).....	104



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA.
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.
FACULTAD DE MEDICINA.

POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

**EFICIENCIA DEL LIPOSOMA A BASE DE QUITOSANO PARA LA
REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA EN RATAS WISTAR.**

Trabajo Especial de Grado como requisito parcial para optar al título de Magister en Ciencias
Médicas Fundamentales.

Autora: Od. Dubraska Suárez

Tutor: Dr. Carlos García

RESUMEN

Los defectos óseos en el macizo cráneo facial son comunes, originando fallas en la reparación del tejido que requieren del empleo de técnicas como la Regeneración Ósea Guiada (ROG). Pero algunas terapias convencionales de ROG producen efectos adversos asociadas al tipo de biomaterial empleado; por ello han surgido tratamientos alternativos, como los andamios a base de quitosano. Se trata de un biomaterial de origen natural, biocompatible, analgésico, antimicrobiano, coagulante, cicatrizante y regenerador óseo. Sin embargo, su efecto como liposoma en la ROG no ha sido estudiado. **Objetivo:** Evaluar la eficiencia del liposoma a base de quitosano, para la regeneración ósea guiada en ratas *Wistar*. **Metodología:** Esta investigación descriptiva, experimental de corte preclínico, fue realizada en 25 ratas *Wistar* machos, adultas con peso entre 350gr-500gr, provistas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes, a los cuales se les creó un defecto longitudinal en ambas tibias (control y experimental). Los animales fueron divididos al azar en 3 grupos: 9 ratas que fueron evaluadas a las 3 semanas, 8 que fueron valoradas a las 6 semanas y 8 para la evaluación a las 9 semanas. **Resultados:** Radiográficamente, el grupo experimental obtuvo mayor porcentaje de parámetros sugerentes de regeneración ósea en comparación con el control, hallándose diferencias significativas ($p=0,001$) entre las medias de regeneración ósea entre ambos grupos. Así mismo los hallazgos histológicos confirmaron que existía mayor actividad osteoinductiva y mayor nivel de madurez ósea en las tibias experimentales a diferencia del grupo control. **Conclusiones:** El liposoma de quitosano fue eficiente para la ROG promoviendo mayor regeneración ósea en menor tiempo que en el grupo control. **Palabras clave:** regeneración ósea guiada, quitosano, ratas *Wistar*, ensayo preclínico

INTRODUCCIÓN

La regeneración ósea guiada (ROG) es una terapia basada en el mismo principio de la regeneración tisular guiada, inducir la regeneración y no la cicatrización de defectos óseos, o mantener el nivel óseo ya existente en zonas edéntulas. Se fundamenta en la utilización de sistemas barrera mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo, excluyendo células provenientes del epitelio gingival y el tejido conectivo en el proceso de cicatrización. Todos estos requisitos han sido difíciles de obtener con las membranas disponibles en el mercado venezolano, pues las reabsorbibles no son totalmente biocompatibles, y las no reabsorbibles deben ser retiradas tiempo después de la cirugía. Tampoco aportan ningún beneficio biológico adicional, actuando como un apósito pasivo o mera barrera física, sin mencionar el alto costo que implica su uso.

Es por ello que es necesario plantearse nuevas pautas terapéuticas enfocadas a la ganancia de tejido óseo, que minimicen o excluyan las consecuencias no favorecedoras para los pacientes, que además sea de bajo costo, se encuentre a disposición para su adquisición y permita su fácil producción en el país. En respuesta a esta problemática, en esta investigación se propuso *Evaluar la eficiencia del Quitosano para la regeneración ósea guiada en defectos óseos creados en tibias de ratas del linaje Wistar*, aprovechando que su producción es un procedimiento sencillo y factible, y aporta excelentes propiedades biológicas.

Los scaffolds de quitosano, sea en forma de membrana o liposoma por su presentación física, pueden superar los inconvenientes adjudicados a los biomateriales usados en la ROG, promoviendo la curación de las heridas por liberación de productos biológicos asociados a él (glucosamina, proteoglicanos entre otros), confirmada además su alta biocompatibilidad por la similitud de las moléculas de éste biopolímero con las proteínas y receptores de la membrana celular.

Este trabajo especial de grado se estructura en cinco capítulos: **El capítulo I** referido a la ubicación y situación actual del problema de investigación, así como los objetivos y justificación del estudio. **En el capítulo II**, se describe los supuestos teóricos que sustentan la investigación, los antecedentes del tema y la delimitación de la hipótesis problema. **Un tercer capítulo** define el marco metodológico de la investigación, donde se hace alusión al tipo y diseño de la investigación, muestra seleccionada, se describen las variables a medir, técnica e instrumentos de recolección de datos, la prueba piloto para la estandarización de los protocolos a utilizar en el estudio, los criterios éticos que rigieron la experimentación en animales, los instrumentos, materiales y equipos utilizados en el experimento, los exámenes diagnósticos y el procedimiento para el análisis de los resultados. **El cuarto capítulo** arroja los resultados radiográficos e histológicos obtenidos y **el quinto capítulo** señala las conclusiones y recomendaciones acerca de la investigación.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

1.1 Planteamiento del problema.

En el ser humano la capacidad regenerativa de los tejidos es limitada, por tanto existen daños que superan la habilidad del organismo de restituir el tejido destruido, situación en la cual indiscutiblemente ocurrirá un proceso de reparación, originándose una cicatrización de la herida, más no una regeneración total del tejido. En el hueso de los maxilares, dependiendo del tamaño del defecto, la regeneración autóloga podrá ocurrir a integridad. Pero el reemplazo del defecto por tejido conectivo es una limitación común de la cicatrización de los defectos óseos en los maxilares, ya que interfiere provocando inestabilidad y limitaciones funcionales y anatómicas.¹

Esta falla regenerativa, es un evento tan común, que ha despertado el interés de muchos investigadores por idear tratamientos que promuevan la regeneración ósea, cuyo producto sea, un tejido anatómico y funcionalmente idéntico al anterior, es decir, bioingeniería de tejidos. Esta ciencia se define como el uso de los principios y métodos de ingeniería, biología y bioquímica, orientados a la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos, y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función^{2,3}

Es así como el uso de andamios o scaffolds para el crecimiento celular tanto *in vitro* como *in vivo*, a base de biomateriales reabsorbibles, ha sido el pilar fundamental de las prácticas regenerativas contempladas en dicha ingeniería de tejidos, pues

permiten guiar ese proceso de regeneración, evitando la invasión celular de tejidos diferentes al que se desea reparar, actuando a su vez como una matriz en la cual las células encuentran un lugar para adherirse, proliferar, y especializarse para formar tejido óseo ⁴.

En relación a ello, la regeneración ósea guiada (ROG), actualmente es una de las terapias con gran auge y éxito, pues ha contribuido a solventar alteraciones odontológicas consideradas como un problema de salud pública como la insuficiencia ósea de los huesos maxilares, que es una situación clínica comúnmente observada en los pacientes portadores de prótesis, o bien, defectos óseos de grandes magnitudes; en donde la ROG acelera el tiempo de curación de las heridas óseas, traducándose en una mejora en la calidad de salud del ser humano⁵.

La regeneración ósea guiada (ROG) es una terapia basada en el mismo principio de la regeneración tisular guiada, la cual consiste en inducir la regeneración y no la cicatrización de defectos óseos, o mantener el nivel óseo ya existente. Se fundamenta en la utilización de sistemas barrera mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo, excluyendo células provenientes del epitelio gingival y el tejido conectivo en el proceso de cicatrización ⁶.

A pesar de que esta técnica ha sido ampliamente utilizada, aún exhibe limitaciones asociadas a los biomateriales usados, pues no actúan como verdaderos andamios, sino como membranas barreras, pasivas y oclusivas ⁷. Así mismo, la mayoría de las membranas disponibles en el mercado venezolano tienen biocompatibilidad discutible, por provenir principalmente de animales, cadáveres, o son de origen sintético y no reabsorbibles, siendo esta última la que genera peor pronóstico, pues se necesita una segunda cirugía para su retiro, sin mencionar el alto costo que poseen⁸. Todas estas desventajas indican la necesidad de nuevas propuestas terapéuticas a base de biomateriales de origen natural, debido a la gran similitud biológica, química y física que presentan comparativamente con los tejidos humanos, lo que implica indiscutiblemente una respuesta adecuada del sistema inmune. En este sentido, se ha prestado considerable atención a los materiales basados en Quitosano debido a sus múltiples propiedades terapéuticas ⁹

El Quitosano es un biomaterial biocompatible, no tóxico, analgésico y antibacterial con propiedades antivirales y antitumorales, tiene efecto hemostático, cicatrizante de heridas, biodegradable ya que puede ser hidrolizado por lisozimas presentes en los fluidos corporales, como la saliva; actúa como un bioadhesivo ¹⁰, ya que al presentar una estructura porosa favorece la integración y vascularización del tejido, tiene una superficie química apropiada para la adhesión, diferenciación y proliferación celular, permitiendo así su unión a las paredes celulares y evitando que sea expulsado fácilmente del defecto óseo, sirve de vehículo para colocar algunos fármacos si se quiere potenciar su efecto ^{11,12}; además de ser un biomaterial de fácil obtención y de bajo costo. Todas estas propiedades y ventajas le aportan beneficios apreciables sobre los demás tratamientos, en consecuencia se presenta como la alternativa de tratamiento más completa para ser utilizado en la ROG.

En Odontología las aplicaciones clínicas del Quitosano usado en forma de membranas, hidrogeles, gelatinas, entre otras, han sido estudiadas en la búsqueda de nuevas propuestas terapéuticas y preventivas ¹³. Se puede mencionar la restitución de tejidos duros y blandos perdidos, tales como el periodonto, la formación nueva de hueso sano, cemento y orientación de las fibras colágenas periodontales del ligamento en la Regeneración Tisular Guiada (RTG) ¹⁴ y la Regeneración Ósea Guiada (ROG), utilizada para cubrir defectos óseos causados por diversas etiologías, tales como: patologías óseas periodontales ^{14,15}, defectos intraóseos ¹⁶. Igualmente se ha estudiado la combinación del quitosano con otras sustancias, por ejemplo: con partículas de Hidroxiapatita (Ha) y Factor de crecimiento fibroblástico ¹⁴, o quitosano con plasma rico en plaquetas ¹⁵. También se aprecia el uso del quitosano como refuerzo del cemento de fosfato de calcio, utilizado como material de relleno óseo ¹⁷ y en la ingeniería de tejidos bucales, como membrana matriz para el cultivo, transporte, fijación y desarrollo de osteoblastos ¹⁸.

A pesar de sus múltiples propiedades y amplia aplicación, para el momento de idear este proyecto, se hizo revisión exhaustiva de la bibliografía en diversas bases de datos como: **PubMed**, **LILACS**, **Medline**, **Sciencedirect**, **Scielo**, **Google Académico**, entre otras, y no se encontraron estudios referentes a la aplicación

odontológica del **quitosano en forma de liposomas usado en conjunto con membrana del mismo principio activo como una forma de tratamiento para la ROG**. Sin embargo, existen referencias que apoyan el uso eficaz de este biopolímero como andamio osteoinductor en animales de experimentación ^{5,16}; propiedades que permiten considerarlo como un biomaterial con elevado potencial regenerativo para tratar defectos óseos. Dentro de éste contexto, con esta investigación se pretendió responder a la siguiente pregunta:

¿El quitosano implantado en un mismo defecto en dos formas físicas simultáneamente, liposoma de Quitosano (LQ) cubierto por una membrana de quitosano (MQ), será eficiente para la regeneración ósea guiada de defectos óseos creados en tibias de ratas del linaje Wistar?

En función de esta interrogante se plantearon los objetivos que a continuación se presentan.

1.2. Objetivo general

Evaluar la eficiencia del Quitosano para la regeneración ósea guiada en defectos óseos creados en tibias de ratas del linaje Wistar.

1.2.1 Objetivos específicos

1.2.1.1. Describir los hallazgos radiográficos presentes en el área intervenida en el grupo control a las 3, 6 y 9 semanas posteriores a la creación del defecto.

1.2.1.2. Describir los hallazgos radiográficos presentes en el área tratada en el grupo experimental a las 3, 6 y 9 semanas post implantación del biomaterial.

1.2.1.3. Describir los hallazgos histológicos en el hueso intervenido de los animales del grupo control en los mismos tiempos de evaluación

1.2.1.4. Describir los hallazgos histológicos presentes en el área intervenida de los animales del grupo experimental a las 3, 6 y 9 semanas post implantación del biomaterial

1.2.1.5. Comparar los hallazgos histológicos y los radiográficos observados intersemanalmente (3, 6 y 9) tanto para el grupo control como el experimental.

1.2.1.6. Establecer cuál fue el grupo que obtuvo la mayor frecuencia de regeneración ósea en el menor tiempo registrado.

1.3 . Justificación.

Estudios demográficos realizados por las Naciones Unidas revelaron que para el 2002 existían 629 millones de personas mayores de 60 años y predijeron para el 2050 la cantidad de 2000 millones de personas. Con el elevado ritmo de envejecimiento habrá un aumento considerable en el número de pacientes que requerirán implantes para corregir defectos o enfermedades del sistema esquelético, como las del reborde alveolar, caderas, entre otros. Por tal motivo, se requiere de un avance en los servicios sociales de salud así como también en las técnicas médico quirúrgicas para tratar dichas alteraciones óseas¹⁹.

La realidad de la práctica odontológica en Venezuela no se desvincula de esta necesidad, pues aún se trata de ejercicio mutilador, abocado a las exodoncias, sumado a que la cultura de salud bucal que la mayoría de la población maneja, está alejada del verdadero enfoque preventivo de la Odontología. Esta situación ha originado una creciente demanda de tratamientos rehabilitadores, que solucionan el problema del edentulismo, pero estos tratamientos no son sinónimo de éxito; ya que la pérdida dental o cualquier otro factor traumático que afecte a los maxilares, generará grandes zonas de reabsorción ósea, difíciles de recuperar. Además, el individuo se ve obligado a usar prótesis mal adaptadas producto de insuficiente terreno protésico, pues es inevitable la reabsorción subsecuente a la pérdida dental.

Esta insuficiencia ósea de los huesos maxilares es una situación clínica comúnmente observada en los pacientes portadores de prótesis, cuya magnitud lo ubican como un problema de salud pública ^{20,21}; afectando a los pacientes

físicamente, y psicológicamente por todos los problemas que acarrea una prótesis mal adaptada.^{22, 23}

Es por ello que se deben crear nuevas pautas terapéuticas dirigidas a la restitución del tejido óseo perdido, usando biomateriales que minimicen el tiempo de espera de esta regeneración. En este particular el quitosano es considerado como un biomaterial osteoinductor^{5,16}, por lo cual se asumiría que acelera el proceso de regeneración ósea, inclusive en la forma física que se plantea en este trabajo especial de grado.

Por otra parte, la regeneración ósea guiada (ROG) como cirugía dirigida a recuperar defectos óseos, es un reto terapéutico debido a riesgos derivados de la biomecánica del hueso, así como de los biomateriales comúnmente usados, que no garantizan un adecuado resultado estético y funcional, debido principalmente al colapso de las membranas empleadas para tal fin. Existe una extensa cantidad de autores^{24, 25, 26, 27, 28, 29} que afirman que aún en defectos cerrados o defecto con paredes óseas conservadas (en el cual solo falta una pared) existen grandes posibilidades de invasión de tejido vecino al defecto óseo, interfiriendo con el proceso de regeneración; por lo que debe considerarse la colocación de un biomaterial, o especialmente una membrana como técnica casi obligatoria a la práctica de toda exodoncia compleja.

En torno a lo anterior se afirma que el potencial de regeneración ósea mediante membranas puede ser incrementado al asociar un material de relleno del defecto (sobre todo en defectos que carecen de varias paredes), ya que evita el colapso de la membrana, aumenta la concentración de factores osteogénicos, y define el contorno anatómico del hueso neoformado.³⁰ Es por ello que en esta investigación se justifica el empleo de un andamio de quitosano en forma de liposoma cubriendo su implantación con una membrana bioadhesiva a base del mismo componente.

En este mismo orden de ideas, las membranas usadas en la ROG pueden ser reabsorbibles y no reabsorbibles, siendo las no reabsorbibles las que presentan mayores inconvenientes ya que tienen que ser retiradas tiempo después de la cirugía y es frecuente que se expongan e infecten⁸; tampoco aportan ningún beneficio biológico

adicional, sin mencionar el alto costo que implica su uso. Los liposomas de quitosano podría ser una alternativa para superar estos inconvenientes, gracias a sus propiedades cicatrizante de heridas, analgésicas, antibacteriales, coagulantes, regenerador de tejido óseo, además de ser un biopolímero abundante en la naturaleza y por lo tanto económico, características que la mayoría de los demás tratamientos no poseen ^{10,12}.

Además el quitosano es altamente biocompatible y bioactivo porque libera productos biológicos asociados a él (glucosamina, proteoglucanos, entre otros) mejorando la promoción de la curación a un ritmo más rápido³¹, propiedades que no poseen los biomateriales de uso convencional en la ROG.

Adicionalmente, en la literatura no se han encontrado estudios donde se exprese la relación del uso de liposomas de quitosano cubierto con membrana del mismo componente como tratamiento para la regeneración ósea guiada, encontrando así un vacío en el conocimiento en esta área. Es por ello que el presente trabajo constituye un aporte a la ciencia, favoreciendo el avance de los conocimientos al poner a prueba las ventajas que posee el quitosano, además de crear una nueva y probablemente una mejor solución terapéutica para solventar los defectos óseos.

Finalmente, es prudente acotar que investigaciones de este tipo son de vital importancia en Venezuela tanto a nivel de ensayos preclínicos y a futuro ensayos clínicos, desprendidas desde grupos de trabajo multidisciplinarios dedicados a la producción de biomateriales, bajo respectiva vigilancia ética y epidemiológica; pues fortalecen la soberanía en salud al producirse insumos y materiales para la Osteosíntesis en el país, productos que normalmente son importados, limitando su uso en gran parte de la población debido a los altos costos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En esta sección se describirán los antecedentes que preceden al estudio y fundamentan esta investigación, desde los que se relacionan indirectamente a los que se hallan íntimamente relacionados, organizados cronológicamente. A pesar de que se encontraron diversos estudios en donde se propone al Quitosano como tratamientos para la regeneración ósea, en la búsqueda de información no se encontraron antecedentes de su empleo en modelos murinos en forma de liposomas para la posible aplicación de la ROG en odontología, y combinado con una membrana de la misma composición para estabilizar el biomaterial implantado.

Sin embargo, existen trabajos de investigación que apoyan el uso del Quitosano sólo y en diferentes combinaciones como andamio para cultivo celular, estimulante de la curación de heridas promoviendo la agregación y adhesión plaquetaria y regenerador óseo a nivel biomédico. A continuación se van a describir algunos de ellos.

Kawakami y cols. en 1992³² prepararon una pasta contentiva de la combinación del Quitosano con Hidroxipatita y la estudiaron en múridos. El examen radiográfico reveló que una radiopacidad irregular similar al hueso apareció en la región donde se encontraba incrustada la pasta. Histopatológicamente se observó la formación de tejido óseo a partir de cartílago, deduciendo que posee rápida degradación osteoinductiva y neovascularización en vivo en tibia iniciándose la

formación ósea a la semana. Estos datos sugieren que la pasta tiene propiedades osteoconductoras, y puede, por tanto, demostrar clínicamente su utilidad como un sustituto del hueso bioactivo.

Fwu-Long y cols. 2001³³ estudiaron una membrana de Quitosano, que presentó pérdida controlada de agua, excelente permeabilidad al oxígeno y la capacidad de drenaje de fluidos, inhibición de invasión de microorganismos exógenos debido a las propiedades antimicrobianas inherentes al biomaterial. Los resultados de este estudio, fueron positivos para la cicatrización de los tejidos, por lo que concluyeron que la membrana de quitosano puede ser adecuadamente empleada como apósito de heridas.

La respuesta observada por este grupo de investigadores, fue tomada en cuenta para la presente investigación, pues si el Quitosano interrumpiera la cicatrización de los tejidos, siendo oclusivo como la mayoría de las membranas usadas en la ROG, no se consideraría para el presente experimento. El Quitosano al poseer propiedad antimicrobiana como la observada por estos autores, permitió infringir en los especímenes del presente ensayo, heridas óseas extensas, con una alta probabilidad de infección agregada, teniendo un margen de seguridad de que se actuaría con el mayor apego a la normativa bioética, ya que los beneficios podría sopesar el estrés generado en dichos animales.

Park y cols. 2003¹⁶, emplearon Quitosano en forma de esponja en perros Beagle, creando defectos intraóseos de 4mm x 4mm, bilateralmente en ambos maxilares a nivel periapical de premolares. Al cabo de 8 semanas evaluaron histológicamente las muestras provenientes del grupo control y experimental. Hallaron diferencias significativas [$p < 0.05$] en todos los criterios evaluados a saber: migración del epitelio conjuntivo, regeneración del cemento y del hueso alveolar, con mejores resultados para el grupo quitosano. Concluyeron que el uso del Quitosano es beneficioso en defectos óseos de una sola pared en ese modelo animal, pues inhibe la migración apical de epitelio (invasión del defecto por tejido conectivo), aumenta la cantidad de cemento y hueso neoformado, lo que según los autores sugiere la potencia del quitosano en la inducción de la regeneración de tejido apical. Esta

investigación representó un precedente importante al momento de elegir el tamaño del defecto óseo que se debía crear en los animales de estudio del vigente trabajo especial de grado, pues el tiempo de estudio era similar [8 semanas] al deseado en este caso [9 semanas], resultando 4 a 5mm una medida de referencia factible de crear y susceptible de medición.

En el ámbito de la ingeniería de tejidos el Quitosano escaló posición gracias a estudios como los de Larena y cols. 2005¹⁸, quienes prepararon biomateriales basados en Quitosano y estudiaron su uso como portadores de osteoblastos en cultivo. Tras la preparación y esterilización de las diferentes formas de Quitosano, realizaron pruebas in vitro de cultivo celular adicionando cada preparación a un cultivo primario de osteoblastos humanos. Analizaron mediante distintas técnicas de microscopía tanto óptica, confocal como con microscopio electrónico de barrido la superficie, homogeneidad, hinchamiento y la penetración en el biomaterial de las células cultivadas. Encontraron penetrabilidad osteoblástica así como crecimiento superficial en distintos materiales de quitosano. Establecieron a partir de estos resultados que el quitosano tiene un excelente comportamiento como membrana matriz para el cultivo, transporte, fijación y desarrollo de osteoblastos.

Shin y cols. 2005³⁴ estudiaron la biocompatibilidad y efecto osteoregenerativo de membranas de nanofibras de quitosano en defectos de 10mm en cráneo de conejos. Al cabo de 4 semanas tomaron muestras del sector y analizaron el aspecto histológico. Observaron osteoregeneración del defecto con formación de hueso idéntico al tejido anterior, demostrando a su vez ausencia de reacción inflamatoria. Estos resultados confirman que la membrana de nanofibra de Quitosano puede ser una herramienta útil para la ROG.

Por otra parte diferentes investigaciones han demostrado la versatilidad del biomaterial y su utilidad en odontología al poder unirse a otros componentes. Así, autores como Yufeng y cols. 2007¹⁵, crearon andamios usando membrana el Quitosano en combinación con un plásmido que portaba el factor de crecimiento B derivado de plaquetas con el objetivo de cubrir defectos óseos causados por diversas

etiologías, principalmente en patologías óseas periodontales. Una vez que realizaron pruebas in vitro de citocompatibilidad, implantaron subcutáneamente el andamio en ratones. Como resultado no solo incrementó la regeneración del tejido sino que potenció la expresión del factor de crecimiento. Este estudio demostró que el andamio es un buen candidato para la regeneración periodontal.

Otra combinación fue presentada por Chang y cols. en el 2007³⁵ quienes usaron Quitosano en la ingeniería de tejidos mediante cartílago estable transformado por factor β -1 transfectado a células madre cultivadas en soportes o scaffolds de quitosano. Estos autores utilizaron soportes de Quitosano ya comercializados en Alemania y desarrollaron cartílago modificado a partir de células madre modificadas con el gen promotor para el factor β -1 que posteriormente injertaron en defectos osteoarticulares en ratones. Doce semanas después observaron que los defectos fueron reparados con cartílago hialino y confirmaron con la detección inmunohistoquímica del colágeno tipo II y la tinción con azul de toluidina de proteoglicanos. Este estudio reafirma la utilidad de soportes de Quitosano en ingeniería de tejidos genéticamente modificados.

En otro estudio Suphasirroj y cols. en el 2008³⁶ investigaron el efecto del grado de desacetilación y peso molecular del Quitosano en andamios de colágeno-Quitosano sobre los osteoblastos, incluyendo la adhesión celular y la proliferación, la actividad de fosfatasa alcalina, la morfología celular y la formación de nódulos mineralizados, mediante la preparación de Quitosano desacetilizado al 80% y 50% con bajo y alto peso molecular y la extracción de colágeno tipo I de colas de rata. Sus resultados refirieron que hubo diferencia estadísticamente significativa en los andamios de Colágeno-Quitosano de bajo grado de desacetilación. Estos autores concluyeron que hubo mayor efecto proliferativo y actividad de fosfatasa alcalina, que en los andamios con alto grado de desacetilación, independientemente de su peso molecular.

Park y cols. en el 2008³⁷, realizaron una combinación de quitosano con polvo de dentina y evaluaron su actividad osteogénica en 75 ratas a las que realizaron un

defecto óseo de 8mm en cráneo. Evaluaron a las 2, 4, 6 y 8 semanas después de la implantación, demostrando la formación de hueso a los 4 días con mayor cantidad de hueso en estos soportes a las 8 semanas, en comparación con los que no contenían quitosano. Concluyeron que esta mezcla puede tener un excelente efecto en la neoformación ósea.

Asimismo, se aprecia el uso del quitosano como refuerzo del cemento de fosfato de calcio, utilizado como material de relleno óseo propuesto por Moreau y col. 2009 ¹⁷. Estos investigadores describen el rol del quitosano para reforzar el cemento de fosfato de calcio (material de relleno óseo en odontología), demostrando la modulación o expresión de marcadores de formación ósea, proliferación y diferenciación de células madres hacia la estirpe osteoblástica. Los autores concluyen que esta combinación reforzada podría ser útil para la regeneración ósea con células madres diferenciadas, con posibilidades en el campo de la cirugía oral y maxilofacial.

Akman y cols 2010 ¹⁴ combinaron el Quitosano con partículas de Hidroxiapatita (Ha) y el Factor de crecimiento fibroblástico. Resultó promotor en la formación de hueso, las células madre mesenquimatosas cultivadas en presencia de este biomaterial, han demostrado una diferenciación de osteoblastos, comparado con los cultivos en ausencia del mismo. Se adjudica la restitución de tejidos duros y blandos perdidos, tales como el periodonto, la formación nueva de hueso sano, cemento y orientación de las fibras colágenas periodontales del ligamento en la Regeneración Tisular Guiada (RTG)

Años más tarde nuevamente el uso del quitosano en modelos murinos con fines de ROG fue evaluado por varios investigadores. Entre ellos Miranda y cols en el 2011³⁸, llevaron a cabo una investigación en ratas, para el uso de un andamio de gel poroso de quitosano, para el desarrollo y la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales de la médula ósea y, observar la capacidad de degradación y biocompatibilidad del material, luego de su injerto en los alvéolos dentarios. Este estudio fue realizado de manera in vitro, aislando y sembrando las células en DMEM en un período de 1, 3, 8 y 14 días. Se obtuvo como resultado que este material promueve la adhesión, difusión y viabilidad de dichas células. Además, presenta una

alta biocompatibilidad y lenta degradación in vivo. Esto indica que el quitosano, promueve la diferenciación osteogénica y ofrece adecuadas propiedades físico-químicas y biológicas para su uso como andamio en la ingeniería de tejidos. Este antecedente orientó la elección del modelo animal utilizado, al confirmar una adecuada respuesta de las ratas, sin mostrar toxicidad y biodegradación de un andamio poroso de quitosano en corto tiempo.

Suárez y cols. 2011⁷ emplearon por primera vez en Venezuela, una membrana de Quitosano elaborada en el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Universidad de Los Andes- Mérida en un caso clínico de regeneración alveolar. Se trató de una paciente femenina de 18 años, sistémicamente sana a la que se le realizó una cirugía de los terceros molares inferiores retenidos. Se realizó la valoración clínica, citológica y radiográfica de dos alvéolos postexodoncia de terceros molares; un alvéolo tratado con membrana de quitosano y otro sin tratar. Para la ROG se hidrató una membrana de quitosano en solución fisiológica, y se cubrió el alveólo derecho con ella. A los 8 días se retiró la sutura y se realizó citología exfoliativa de ambas zonas. Se tomaron fotografías a los 15 y 30 días. También se realizaron radiografías panorámicas, a los 15 y a los 30 días, repitiendo el estudio a los 7 meses postquirúrgicos.

Como resultados observaron que a los 8 días se la zona izquierda cursaba con dehiscencia de la herida, empaquetamiento de alimentos; mientras que en el lado derecho, fue menor el grado de inflamación y eritema, mejor cicatrización y escasa acumulación de placa. Al mes la mucosa en el lado derecho presentó óptimos signos de cicatrización, mientras que en izquierdo persistió acumulación de placa bacteriana. Radiográficamente, a los 15 días, en el lado derecho se observó continuidad de la zona intervenida con el hueso circundante y escasa aposición mineral. Al mes la densidad mineral fue moderada (50 y 80 % del defecto). A los 7 meses postoperatorios la aposición mineral fue abundante (mayor al 80 %). La citología Clase I Papanicolau del lado derecho evidenció porciones aisladas de la membrana de

quitosano desprendidas, escasos elementos epiteliales aislados, sin evidencia de componentes inflamatorios. Concluyen que el alveólo tratado con quitosano regeneró más rápido y el proceso inflamatorio fue menos agresivo que en el lado no tratado, por lo que indican continuar investigando la eficiencia de dicha membrana en la ROG para recomendar su uso. El aporte de este caso clínico radica en la posibilidad de comparar tanto la biocompatibilidad del mismo tipo de membrana de Quitosano que fue utilizada en el presente trabajo especial de grado y permitirá extrapolar el tiempo de biodegradación de la membrana en un alveólo humano con relación a un defecto óseo en un modelo murino.

Campo y col. 2011⁵ compararon la efectividad de membranas de Quitosano con y sin Hidroxiapatita para la Regeneración Ósea Guiada en defectos óseos. Para ello realizaron un ensayo preclínico creando defectos óseos en tibia de 20 ratas del linaje Wistar, machos, con un peso comprendido entre 300gr-350gr y de 3 a 6 meses de vida, aportadas por el Bioterio de la Universidad de los Andes (BIOULA).

Implantaron en una tibia membrana de quitosano cargada con hidroxiapatita y en otra la membrana de quitosano sin ningún aditivo ambas presentaciones elaboradas en el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela). Evaluaron radiográfica e histológicamente la zona tratada a las 2 y a las 4 semanas postimplantación.

Radiográficamente encontraron mayor nivel de regeneración ósea en el lado tratado con la membrana cargada con hidroxiapatita. Histológicamente las diferencias no fueron significativas en ambos grupos. Concluyen que el uso de las membranas a base de Quitosano con y sin hidroxiapatita permite el incremento de las características de ambos biomateriales lo que trae consigo un mejor rendimiento en el proceso de la ROG. El aporte de esta investigación radica en que los autores utilizaron el mismo modelo animal considerado en la presente investigación; también la misma membrana de quitosano y persiguiendo el mismo objetivo, como lo es valorar la regeneración ósea en defectos creados en tibias de ratas en presencia del biomaterial.

Araujo J y col. 2012 ³⁹ realizaron un estudio comparativo de la eficiencia del xerogel y liposoma a base de quitosano para el tratamiento de la osteítis alveolar en ratas wistar. El xerogel de quitosano, fue elaborado por el Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA) de la Universidad Simón Bolívar (Caracas-Venezuela). El liposoma de quitosano provino del Centro de investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela).

Este estudio experimental preclínico descriptivo, fue realizado en 15 ratas Wistar machos, adultas con peso entre 300gr-350gr, provistas por el Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), a los cuales se les extrajo el incisivo superior derecho y se indujo la osteítis alveolar. Los animales fueron divididos al azar en tres grupos: 5 ratas para el grupo control, 5 ratas para el grupo A tratadas con xerogel y 5 ratas para el grupo B con liposoma. Estos grupos fueron evaluados clínicamente a los 3, 7, 10, 14 días, y radiográfica e histológicamente a los 7 y 14 días. Como resultados encontraron que los signos clínicos remitieron más rápidamente con el liposoma, seguido por el xerogel y en último lugar el grupo control. Radiográficamente, el liposoma produjo regeneración ósea más acelerada en comparación con el xerogel. En último lugar, los hallazgos histológicos determinaron que la regeneración del alvéolo es semejante con el liposoma y el xerogel, a diferencia de que con el xerogel, las zonas osteoides se observaron más densas que con el liposoma. Concluyeron que tanto el liposoma como el xerogel a base de quitosano representan una excelente terapéutica para la osteítis alveolar en ratas Wistar, siendo más eficiente el liposoma.

Esta investigación representa un referente obligatorio pues aplican la otra presentación física empleada en este trabajo especial de grado, el liposoma de quitosano aunque para una situación distinta, la alveolitis que implica infección del hueso alveolar. Dichos investigadores confirmaron el efecto osteoinductor del liposoma y su acción antimicrobiana local. Aún cuando se trataba de una patología que cuyo diagnóstico es clínico, la razón por la cual evaluaron indirectamente parámetros de regeneración ósea es que ésta respuesta puede ser un indicador clave para establecer remisión de la alveolitis y curación total del alvéolo.

2.2. Fundamentos Teórico Conceptuales

Entre todos los seres vivos, el humano es el único cuya tasa de regeneración es inversamente proporcional a su filogenia evolutiva, siendo el hueso el único tejido (a excepción del tejido embrionario) en constante renovación que posee integra su capacidad de regenerar a integridad. Sin embargo, dependiendo del tipo de defecto y los factores causales de las lesiones óseas, existen situaciones en las cuales la regeneración ósea puede verse truncada y es necesario hacer mano de técnicas que estimulen una correcta reposición del tejido.

Esta constante renovación ósea, caracterizada por una homeostasis entre reabsorción y aposición ósea, renueva un 5% del hueso cortical y un 20% del trabecular al año, lo que representa una renovación de un 5-10% del hueso total al año^{40, 41}. El remodelado óseo está presente a lo largo de la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo. A partir de aquí, existe un predominio de la reabsorción y la masa ósea empieza a disminuir. También participan en este proceso factores mecánicos o traumáticos cuya energía física provoca una zona de deformación y por ende de reabsorción; así como algunos procesos infecciosos, alteraciones hormonales, genéticas, vasculares, nutricionales, neoplasias, pueden llegar a establecer una pérdida ósea que supera la capacidad de respuesta regenerativa del sistema.

En relación a esto, en el macizo craneofacial, los defectos óseos pueden derivarse de diferentes enfermedades unas más complejas y de mayor cronicidad y extensión que otras. Por ejemplo, algunas pueden deberse a la instalación de patologías algunas de origen genético y otras congénito, que afectan a los maxilares como la agenesia de los maxilares, micrognatia, hendiduras labiopalatinas, osteogénesis imperfecta, disostosis cleidocraneal, osteoesclerosis; o bien a enfermedades osteofibrosas distróficas de los maxilares (displasias ósea fibrosa, querubismo, fibroma osificante, osteítis deformante, granuloma central de células gigantes)³⁰.

También algunas enfermedades metabólicas como la osteoporosis, osteomalasia y el tumor pardo por hiperparatiroidismo provocan defectos óseos por desbalance en la tasa de regeneración. Otras patologías más circunscritas a la boca tienen un papel en la génesis de defectos en hueso como las del grupo de patologías inflamatorias infecciosas (osteítis alveolar, periostitis, osteomielitis, osteonecrosis) así como las de origen quístico (quistes odontogénicos inflamatorios, del desarrollo, no odontogénicos, pseudoquistes). Los más agresivos suelen ser los tumores, sean de origen odontogénico o no, los cuales pueden ser benignos o malignos (ameloblastomas, odontomas, osteomas, osteosarcomas y mielomas)^{42,43}.

Entonces, ante la diversidad de patologías que pueden ocasionar defectos óseos que varían en localización, magnitud y estructuras que involucra, la premisa es evaluar los antecedentes clínicos, imagenológicos e histológicos completos, con la finalidad de establecer un diagnóstico definitivo certero y establecer un correcto plan de tratamiento, que además incluya la regeneración ósea guiada de dichos defectos residuales.

www.bdigital.ula.ve

En relación a ello, la regeneración ósea guiada (ROG), actualmente es una de las terapias con gran auge y éxito en el ámbito biomédico, pues ha contribuido a solventar alteraciones odontológicas consideradas como un problema de salud pública⁴ como la insuficiencia ósea de los huesos maxilares, que es una situación clínica comúnmente observada en los pacientes portadores de prótesis, o bien defectos óseos de grandes magnitudes, en donde la ROG acelera el tiempo de curación de las heridas óseas, traduciéndose en una mejora en la calidad de salud del ser humano.

Pero la utilización de diferentes métodos regenerativos en defectos óseos ha sido, en los últimos años, un tema controvertido en la literatura y desvirtuado, convirtiéndose la elección de un biomaterial o la aplicación de la técnica como una fórmula universal, utilizada según lo dictamine la práctica de moda, marcada muchas veces por las preferencias personales de cada clínico, sin tomar en cuenta que para el éxito de la técnica cobran importancia temas como la composición química y

mecanismo de acción de los biomateriales a usar, los verdaderos requerimientos del paciente, su condición sistémica, los mecanismos biológicos y moleculares que subyacen a la técnica, la relación costo-beneficio y los procedimientos mínimamente invasivos. El interés de ésta sección es hacer una revisión bibliográfica sobre la regeneración ósea guiada, haciendo un especial énfasis en las consideraciones biológicas, en sus indicaciones, biomateriales disponibles y requerimientos que deberían cumplir para su elección, y algunos principios quirúrgicos generales de la técnica.

Breve historia de la regeneración ósea guiada

Los primeros reportes que mencionan la idea de rellenos de defectos óseos datan del siglo XIX. El principio conocido como regeneración ósea guiada fue descrito por primera vez en 1959 por Hurley y cols., en el tratamiento de la fusión espinal. En la década de los ´60 Boyne y otros colaboradores⁴⁴ probaron la utilidad de filtros microporosos de acetato de celulosa, en la reconstrucción de defectos óseos corticales de huesos largos y del esqueleto facial, los cuales utilizaron para excluir el tejido conectivo del defecto óseo, estableciendo un medio favorable para la osteogénesis. Sin embargo, no fueron estos estudios los que dieron lugar a la amplia aplicación clínica. Dos décadas después, Nyman y cols.⁴⁵, examinaron sistemáticamente el método de barrera de membranas en varios estudios clínicos y experimentales aplicados a la regeneración periodontal, fijando las bases de un nuevo abordaje terapéutico de la enfermedad periodontal y dando lugar al reconocimiento de su gran potencial como aplicación clínica en odontología.^{46, 24}

A finales de la década de los ´80 Dahlin y cols.⁴⁷, fueron los primeros en describir esta técnica en cirugía bucal, utilizando membranas en defectos óseos propiciados por extracciones dentales. Consideraron a la ROG una técnica de estimulación, para la formación de hueso nuevo en áreas donde hubiera deficiencias, o como terapia complementaria a la colocación de implantes.

Aunque existen varios métodos para solventar problemas de deficiencia de hueso, uno de los más comunes ha sido la utilización de hueso autólogo; pero este procedimiento requieren hospitalización, además de un alto riesgo de morbilidad en las áreas donantes⁴⁸. Más tarde los injertos óseos autólogos fueron reemplazados por injertos alogénicos. Durante las últimas cuatro décadas se han desarrollado más y más materiales sintéticos y xenogénicos como materiales de sustitución, cada grupo con ventajas y desventajas asociadas al riesgo inmunológico de transmisión de enfermedades sobretodo en los productos de origen animal como el colágeno bovino^{49,50}.

Biología ósea

Para comprender el principio de la técnica, es imperante comprender los procesos biológicos que se suceden en la fisiología ósea. El hueso es el principal componente del esqueleto que posibilita la acción mecánica de la musculatura, protege órganos vitales y alberga la médula ósea hematopoyética. Su **matriz orgánica o sustancia osteoide** sirve además de reservorio de calcio, fósforo y otros iones⁵¹ como una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular, en la integridad y función del tejido óseo^{40,52}.

Histológicamente, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está formado por osteonas estructurado en laminillas de matriz osteoide mineralizada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso. El hueso cortical o compacto se estructura en conductos de Havers por donde pasa el paquete vasculonervioso para darle nutrición al tejido. Dichos conductos están recubiertos de laminillas en disposición concéntrica, dejando unas lagunas u osteoplastos donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular lo constituyen laminillas óseas en forma de red que delimitan cavidades areolares o canal medular en cuyo interior se encuentra la médula ósea (Figura 1).

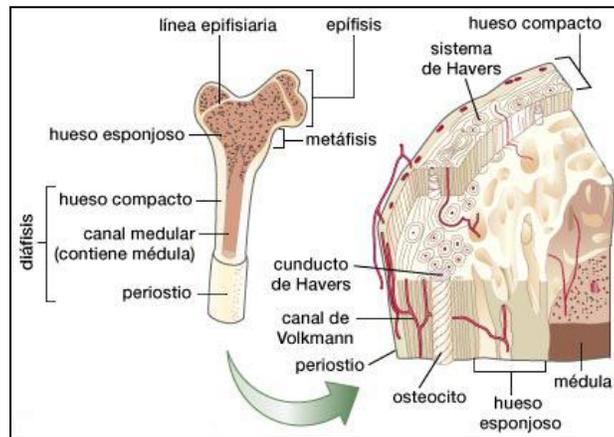


Figura1. Estructura del hueso

Fuente: <http://www.ferato.com/wiki/index.php/hueso>

Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen **células especializadas, matriz orgánica y fase mineral**⁵³. Dicha matriz orgánica o sustancia osteoide, está conformada principalmente por el **colágeno tipo I (90%)**. La otra porción restante está representada por colágeno tipo III, **proteínas no colágenas** (proteoglicanos, proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico, glicoproteínas, proteínas procedentes del plasma, factores de crecimiento) cuya expresión se encuentra marcada durante la osteogénesis, crecimiento y diferenciación celular. La **fase mineral** del hueso está constituido principalmente por cristales de hidroxapatita (fosfato tricálcico) y carbonato cálcico y otras sales minerales (magnesio, flúor) que se depositan por cristalización en el entramado formado por las fibras de colágeno, luego por acción de la fosfatasa alcalina se induce el proceso de mineralización⁵⁴.

Asimismo, el tejido óseo alberga varios tipos de células (Tabla 1), bien sea alojadas dentro del propio tejido óseo; o en el estroma de la médula ósea, el cual es rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (stem cells o mal llamadas “células madres”). Estas células mesenquimales, según sea el mecanismo de

señalización molecular específico para que cada tipo de célula se especialice, pueden dar origen a cinco líneas celulares: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos.⁴⁰

Tabla1. Células óseas.

ESTROMA MEDULAR	CÉLULAS EN QUE SE DIFERENCIAN EN EL TEJIDO ÓSEO
Stem cells hematopoyéticas	Osteoblastos
Stem cells mesenquimales	Pre-osteoblastos
Adipocitos	Osteocitos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-osteoclastos
Células endoteliales	Células linfoides

Fuente propia

www.bdigital.ula.ve

Proceso de regeneración ósea

Una lesión en los huesos maxilares, se recupera siguiendo las etapas del proceso de cicatrización del hueso intramembranoso⁵⁵, es decir, formación de hueso sobre las membranas de tejido conectivo fibroso, a partir del mesénquima sin pasar por una etapa cartilaginosa. Dentro del marco de todo este proceso de osificación existen 3 mecanismos de control óseo que resultan básicos y se describen en la Tabla 2.

Tabla2.Procesos implicados en la neoformación ósea.

Mecanismo	Descripción
Osteoinducción	Transformación de células precursoras en células osteogénicas
Osteogénesis	Las células osteogénicas forman depósitos de matriz mineralizada
Osteoconducción	Formación de hueso sobre la superficie de un andamio (matriz colágena fisiológica o el andamio implantado)

Fuente propia

Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. De igual modo en este proceso será fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización. Se trata de un constante proceso de remodelación ósea que sucede durante toda la vida. A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas Unidades Básicas Multicelulares. En el esqueleto humano existen 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años, permitiendo la homeostasis del metabolismo fosfocálcico⁵⁶.

Ante un daño que rompe la continuidad del hueso y como solución a ello se implanta un biomaterial, éste debe actuar como **estímulo biológico** para la especialización celular propio del tejido óseo; es decir que logra la osteoinducción. Se indica un biomaterial **osteoaductivo** mientras menor número de paredes óseas tenga el defecto óseo.

En la **osteoconducción** el biomaterial proporciona un andamio o **scaffold** en el que se depositan las células progenitoras, dando lugar toda la bioquímica necesaria para el crecimiento óseo y mineralización de la matriz ósea. En el caso de los andamios tridimensionales su función es decisiva en esta fase; mientras que las membranas logran este propósito siempre que sean porosas de forma tal que en dichos poros logren adherirse las células y comenzar desde allí la siguiente etapa.

En la **Osteogénesis**, la deposición de nuevo hueso por parte de estas células osteogénicas se da después de la osteoconducción, y generalmente es un proceso donde solo participa el organismo y no tiene tanto protagonismo el biomaterial. Sin embargo, hay biomateriales que histológicamente han demostrado estimular la osteogénesis, como es el caso del plasma rico en plaquetas. Existen dos tipos de osteogénesis: osteogénesis a distancia y osteogénesis de contacto. En la primera, el tejido óseo se forma desde la superficie del hueso circundante. En la segunda, la formación de tejido óseo se produce desde la superficie del implante.

En la osificación es imprescindible el correcto rol de las células, la matriz extracelular y los vasos sanguíneos. La secuencia de procesos biológicos que se suscitan en la regeneración ósea discurre en el siguiente orden:

- Respuesta inflamatoria y formación de hematoma inicial, con eritrocitos, plaquetas y fibrina (sangrado y coagulación).
- Las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales.
- Las señales moleculares anteriores promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular, que reemplazará al coágulo inicial (fibroplasia y angiogénesis).
- Degradación del coágulo y limpieza de la herida (incluida la biodegradación parcial o total de la membrana).

- Formación de tejido granular.
- Síntesis proteica y mineralización de nuevo hueso.
- El hueso aparece inicialmente en forma de red constituida por trabéculas (el hueso esponjoso primario).
- El hueso esponjoso primario es sustituido por hueso secundario, posteriormente suprimido para eliminar la médula ósea, o transformado en hueso cortical primario mediante la ocupación de los espacios entre las trabéculas.
- Modelado (modificaciones en el tamaño y forma del hueso en función de reabsorción y aposición ósea) y remodelado óseo (transformación del hueso inmaduro, de tipo esponjoso, en hueso laminar más compacto)^{40,57}. Respecto a ésta última fase a continuación se detallan cada uno de los eventos que ocurren durante el remodelado.

www.bdigital.ula.ve

Fases del remodelado óseo

El remodelado óseo se divide en las siguientes fases^{40,41}:

1. **Fase quiescente:** Se denomina así cuando el hueso se encuentra en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.
2. **Fase de activación:** los factores locales y sistémicos inician la activación del remodelado óseo por células osteoblásticas. En esta fase se activan, migran y se diferencian las células hematopoyéticas precursoras de la estirpe osteoclástica para que de su diferenciación surjan los osteoclastos. También los factores generales (hormona paratiroides, metabolitos de la vitamina D, osteocalcina) y locales (citoquinas: IL-1 y TNF- α) activan el proceso de remodelado por mecanismos variados.

El primer fenómeno que sucede es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos^{58, 59, 60}.

3. Fase de reabsorción: Posteriormente los osteoclastos comienzan a desintegrar la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide mediante fosfatasa ácida y enzimas proteolítica liberando mineral óseo y fragmentos colágenos quedando unas cavidades llamadas lagunas a las cuales se desplazarán los osteoblastos en la siguiente fase para producir nuevo hueso. También los osteoblastos producen osteoprotegerina, o factor inhibidor de la osteoclastogénesis, cuyo papel es frenar la actividad del osteoclasto. Al finalizar la actividad resorptiva, los macrófagos eliminan a los osteoclastos y permiten la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz. Dura de 1-3 semanas.

4. Fase de formación: Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan proteínas morfogenéticas óseas, responsables de la diferenciación en osteoblastos maduros (osteocitos). A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar colágeno tipo 1 y otras sustancias (osteocalcina) para formar la sustancia osteoide, de naturaleza orgánica que rellenará las zonas perforadas. Esta fase puede durar hasta 1-3 meses y la aposición de la nueva matriz se realiza por capas de forma ordenada.

5. Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular; nuevamente empieza la fase quiescente o de descanso.

Por lo tanto, la neoformación ósea es un proceso que puede ocurrir alrededor de las 16 semanas, con variaciones asociadas al tipo de defecto y tamaño, así como diferencias individuales en el metabolismo óseo e inmunocompetencia (Figura 2).

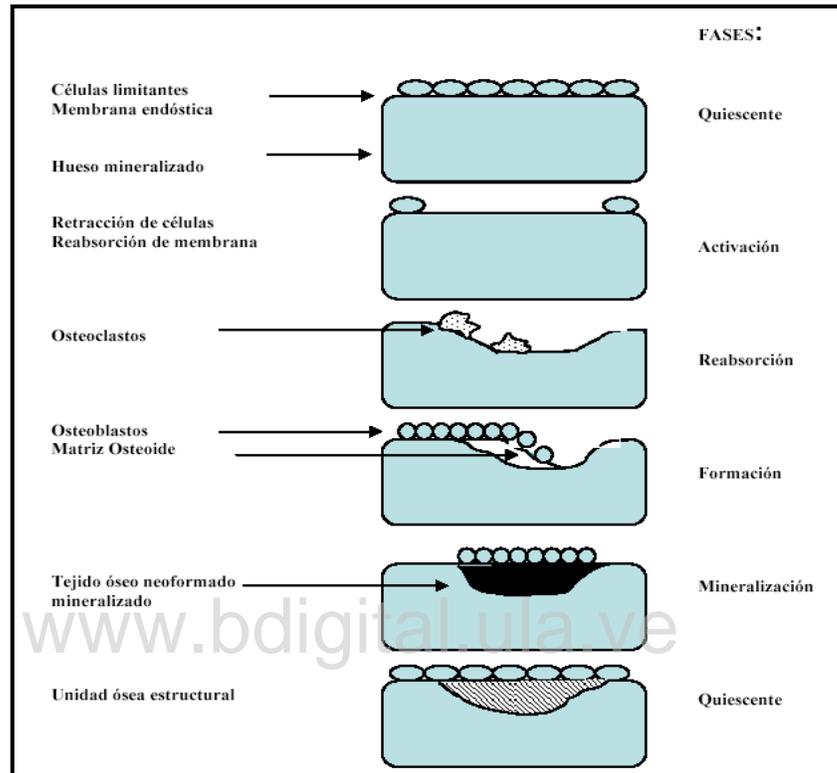


Figura 2. Fases del remodelado óseo. Tomado de Fernández y cols.⁶¹

No obstante, la formación de nuevo tejido óseo visto como imagen típica radiopaca, puede ser evaluado radiográficamente después de 45 días, debido a que este es el tiempo que tarda la fase de mineralización. A continuación a manera de resumen se representa gráficamente (Figura 3) el proceso de regeneración ósea en función del tiempo:

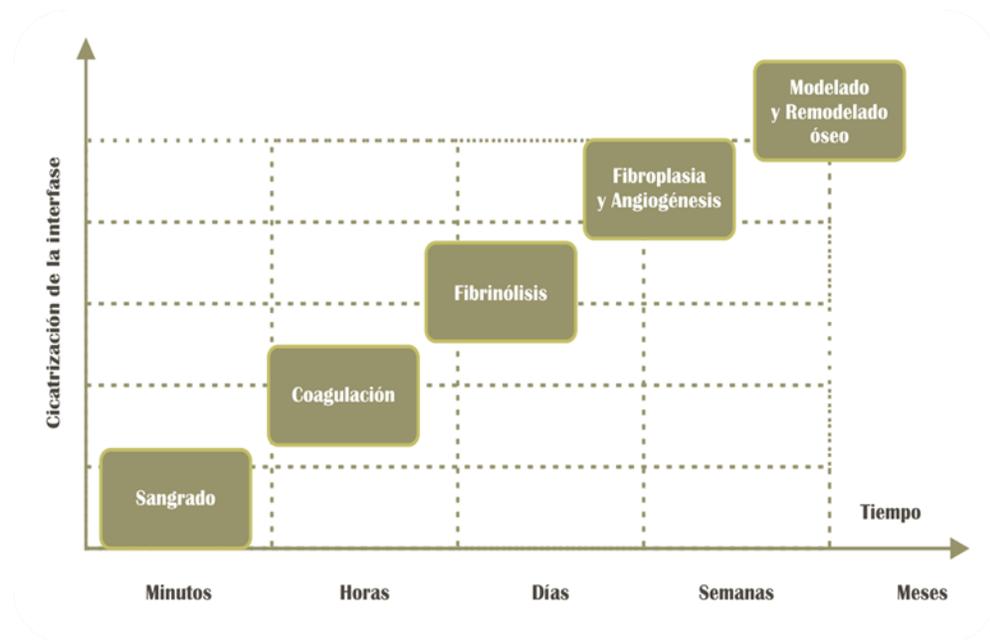


Figura3. Etapas biológicas que sigue la cicatrización de la interfase hueso-membrana o biomaterial para la ROG. Tomado de Sfeir y cols.⁶²

www.bdigital.ula.ve

Aunque el organismo está preparado para acudir a este proceso de neoformación ósea constantemente para subsanar las microfallas del sistema óseo, en muchas oportunidades, la influencia de muchos factores ya mencionados con anterioridad, en especial el tamaño del defecto óseo e intensidad de la injuria, retrasan este proceso de cicatrización, pudiendo no consolidarse la herida. Afortunadamente, la ingeniería de tejidos en su avance nos presenta un abanico de posibilidades para estimular la regeneración ósea, alternativas cuyo éxito radica principalmente en los biomateriales usados para tal fin.

Mecanismo de acción de la ROG

Antes de definir la técnica de ROG es pertinente conceptualizar la Regeneración Tisular Guiada como técnica matriz. Se entiende por regeneración la

respuesta tisular que ante un trauma (mecánico o infeccioso) consigue la restitución a integridad, es decir el nuevo tejido conserva las características idénticas al original; a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original.

La ROG es una terapia para inducir la regeneración de defectos óseos o mantener el nivel óseo ya existente en zonas edéntulas. Se fundamenta en la utilización de sistemas barrera mediante membranas que aíslan un determinado defecto óseo (Figura 4), excluyendo células provenientes del epitelio gingival y el tejido conectivo en el proceso de cicatrización^{6, 63}. Sin embargo, la técnica va más allá de la simple colocación de membranas, se trata de toda terapéutica basada en el uso de biomateriales bioactivos, implantándolos en el sitio de la lesión ósea, con el fin de promover la regeneración a integridad del tejido.



Figura4. Procedimiento para aplicar la regeneración ósea guiada en herida alveolar.

Tomado de <http://www.procini.com/images/gbr.jpg>

Tradicionalmente los defectos óseos se han tratado implantando tejidos autólogos (**Autoinjertos** de fragmentos de hueso del paciente), alogénicos (o **Aloinjertos** de hueso de cadáver acelular procesado), xenogénicos (o **Xenoinjertos**: porciones de hueso provenientes de animales) o en otros casos implantando **materiales sustitutos sintéticos** o también llamados materiales aloplásticos inertes (metales, plásticos, cerámicos y vitrocerámicos) ^{2, 64}.

Todos tienen ventajas y desventajas asociadas, pero llama poderosamente la atención lo útiles que han resultado los de origen natural como el plasma rico en plaquetas, el plasma rico en fibrina, y otros de origen natural pero provenientes de la geología marina como la hidroxiapatita, y derivados de crustáceos como la quitina, el quitosano, cuyas propiedades superan abismalmente a las tradicionales membranas no reabsorbibles y la mayoría de materiales de relleno óseo.

Adicionalmente, se debe conocer cuáles son los biomateriales generalmente dispone para el relleno, y como membranas de ROG, según su función en los procesos de control óseo, de forma tal que posea un sinnúmero de criterios científicamente establecidos a la hora de tomar una elección. A continuación en la Tabla 3 se resumen los biomateriales para ROG de acuerdo a su interacción con el tejido receptor y su papel en la neoformación ósea.

Tabla3. Clasificación de los biomateriales para ROG.

Mecanismo de neoformación ósea	Tipo de material según su origen	Ejemplos
<i>OSTEOCONDUCTORES:</i>	Aloplásticos (cerámicas bioactivas) Cerámicas de vidrio bioactivas	Hidroxiapatita Carbonato de calcio Fosfato tricálcico Sulfato de Calcio Polímeros sintéticos (politetrafluoretileno) Metálicos (oro, titanio, platino) Bifásicos o combinaciones
	Xenoinjertos (heterólogo u origen animal)	Hueso animal Desproteínizado Colágeno bovino, porcino Cartílago
<i>OSTEOINDUCTORES:</i>	Aloinjertos (homólogos o de donantes fallecidos)	Hueso humano congelado Hueso humano liofilizado
	Autólogos (autoinjertos o tomados del mismo individuo)*	Hueso autólogo Colágeno autólogo Proteínas derivadas del plasma rico en plaquetas (PRP) Proteínas morfogenéticas (BMP) Células madre
	Nuevos biomateriales heterólogos	Derivado de matriz del esmalte Quitosano Transplante de tejidos propios o creados in vitro
<i>OSTEOGÉNICOS:</i>	Autógenos	Hueso autólogo, Plasma Rico en Plaquetas

Fuente propia.

Una opción más en boga con fines regenerativos es la ingeniería de tejidos basada en scaffolds o andamios bidimensionales o tridimensionales, tratándose de biomateriales de origen natural o sintético, logrados en meticulosos procesos de laboratorio. Estos dispositivos proporcionan a las células el sostén necesario para su proliferación y un ambiente adecuado para el mantenimiento de sus funciones.^{4,65}

La ingeniería de tejidos es una alternativa al trasplante de órgano o tejido para reparar una disfunción. Es la disciplina que se centra en el desarrollo de sustitutos biológicos (biomateriales) que se implantarán en sitio lesionado para restaurar, mantener o mejorar su función. Estos biomateriales deben reproducir la función de los tejidos vivos en sistemas biológicos, pudiendo permanecer de forma temporal o permanente en el cuerpo, para conseguir la restauración de un defecto o suplantar un órgano faltante.

Sin embargo, en la bioingeniería se prefiere el uso de sistemas biodegradables, es decir que no permanezcan permanentemente en el organismo. Para la creación de este tipo de implante se pueden cultivar células o bien generar sustratos que estimulen y permitan su proliferación, ya que es bien sabido que las células aisladas no pueden formar tejido por si solas. Estas células dependen del anclaje y requieren medios específicos, una plantilla, que en caso del tejido óseo asemeje la matriz condral.

Estos sustratos se tratan principalmente de andamios, que para la regeneración ósea debe cumplir con algunos requisitos dependientes tanto de la geometría, composición química del material y las propiedades mecánicas óptimas para que la viabilidad celular, proliferación y regeneración sean posibles. En torno a ello, al momento de seleccionar o diseñar un andamio tridimensional se deben considerar que éste cumpla con ciertos criterios ideales, tales como los propuestos en la Tabla 4.

Tabla4. Requerimientos en el diseño y elección de un andamio para regeneración ósea guiada

<p>Biocompatibilidad:</p>	<p>Integración adecuada al tejido hospedero sin presentar efectos genotóxicos, citotóxicos o causar reacciones de hipersensibilidad. Hay 4 tipos de respuestas descritas como biocompatibles:</p> <p>a. Inerte: generan poca o ninguna respuesta.</p> <p>b. Interactivo: generan una respuesta específica y beneficiosa.</p> <p>c. Viable: con incorporación de células vivas, que son reconocidos por el organismo como tejido normal.</p> <p>d. Materiales implantables consistentes de tejido nativo, desarrollado in vitro a partir de células del paciente.</p>
<p>Biodegradabilidad:</p>	<p>Posible solo con los biomateriales de tercera generación o biodegradables. Debe permitir su hidrólisis, decrecimiento del peso molecular, rompimiento de sus enlaces y la reducción de la rigidez del andamio, dando paso a la regeneración ósea mientras se produce la degradación del andamio.</p>
<p>Osteoinductividad:</p>	<p>Sea por su bioactividad o por su configuración física, debe dar alojamiento adecuado para que ocurra la migración y diferenciación celular hacia la línea osteogénica</p>
<p>Propiedades mecánicas similares al tejido óseo:</p>	<p>Dependerán de la configuración del andamio, distribución de los poros, espesor de las interconexiones, rigidez del material, la elasticidad, absorción de líquidos y sustancias del medio, estabilidad dimensional y la tasa de degradación química del andamio.</p>
<p>De fácil procesado, modificable , reproducible y esterilizable:</p>	<p>Para obtener distintas configuraciones en atención al tipo y tamaño del defecto óseo.</p> <p>Debe permitir la incorporación o el contenido de aditivos o agentes activos.</p>

Fuente propia.

En la Figura 5, se observa como el andamio o scaffold actúa en la regeneración ósea. En (a) se muestra el estado de disfunción mecánica del hueso

cuando hay una fractura o defecto, que se repara con el emplazamiento de un andamio de similares propiedades mecánicas al hueso sano (b). Durante el proceso de degradación del andamio se producirá la regeneración ósea, por lo que las propiedades mecánicas se verán compensadas (c) hasta la reparación total del defecto (d).

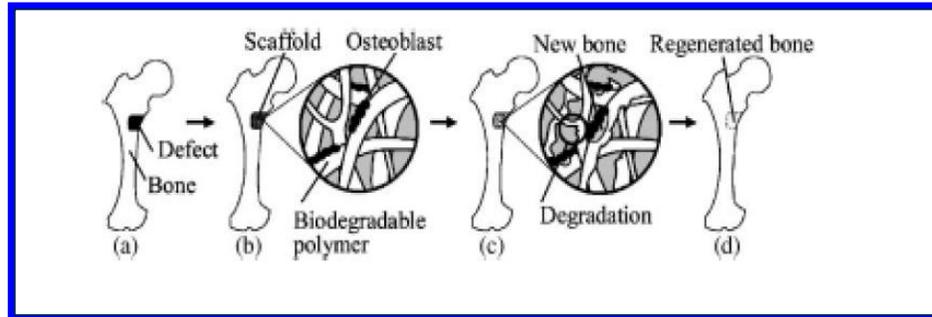


Figura5. Esquema de la función mecánica del andamio biodegradable hasta la regeneración ósea. **Modificado de Adachi y cols.** ⁶⁶

Independientemente del biomaterial, la regeneración ósea guiada ha probado ser una técnica fiable tanto en experimentos en modelos animales como en clínicos. Se ha determinado que la neoformación ósea en dicha técnica deriva de dos posibles regiones, o bien se desarrolla a partir del periostio y de células derivadas de la región medular con potencial osteogénico; o de la técnica lo que hace es facilitar el reclutamiento de células con potencial osteogénico de las poblaciones celulares de los canales haversianos y de volkmann, y principalmente del endostio⁵⁰.

La eficacia de las membranas en conjunción con la regeneración ósea y los tratamientos reconstructivos es probablemente el resultado de la combinación de distintos mecanismos mecánicos, celulares y moleculares ^{67,68}.

Indicaciones y contraindicaciones de la ROG

De acuerdo con los protocolos y guías de práctica clínica en cirugía bucal ^{69,70} las indicaciones más comunes para realizar la ROG son:

1. Aumento de reborde alveolar.
2. Defectos óseos de 2 y 3 paredes.
3. Pacientes que presentan atrofia severa en los procesos alveolares (edentulismo parcial o total), con la finalidad de insertar implantes dentales.
4. Con la colocación simultánea de implantes en alvéolos postextracción inmediata.
5. Con la colocación de implantes en alvéolos postextracción no inmediata.
6. Durante el tratamiento implantológico, en caso de fenestraciones.
7. Defectos en dehiscencia.
8. Defectos de resecciones oncológicas.
9. Pérdida de sustancia ósea de etiología traumática.
10. Tras la realización de una quistectomía, apiceptomías.

Del mismo modo, estos autores ^{69,70} introdujeron las siguientes contraindicaciones de la técnica:

- Defectos óseos de 1 pared (salvo que sea extenso el defecto).
- Pacientes con patología sistémica no controlada.
- Pacientes sometidos a radioterapia de cabeza y cuello.

- Pacientes bajo tratamiento con bisfosfonatos.
- Individuos de edad avanzada donde la intervención quirúrgica pueda comprometer su estado de salud.
- Lesiones tumorales, quistes o lesiones agresivas (luego de su resección quirúrgica, no se puede aplicar Plasma Rico en Plaquetas por su alto contenido en factores de crecimiento).
- Procesos activos, agudos de infección.

Principios quirúrgicos generales de la técnica en odontología.

Placencia y cols.⁵⁰ establecieron una secuencia de pasos generales que deben considerarse para aplicar la regeneración ósea guiada mediante membranas, independientemente del tipo de defecto. En seguida se presenta una modificación de dicha secuencia:

- Llenado de la historia clínica. Firma del consentimiento informado.
- Preparación del material e instrumental.
- Asepsia y antisepsia del campo operatorio.
- Técnica anestésica.
- Incisión inicial alejada del defecto para que no interfiera en la regeneración de éste.
- Levantamiento del Colgajo mucoperióstico de espesor completo.
- Desbridamiento o curetaje de todo tejido de granulación o fibroconectivo existente en el defecto (por ejemplo, en perimplantitis).

- Lavado y detoxificación del lecho con solución fisiológica o cualquier medicamento antibiótico si se requiere.
- Preparación del biomaterial a injertar.
- Relleno del defecto óseo (opcional).
- Fijación y colocación de la membrana: se recorta para que supere máximo 2 o 3 mm del borde del defecto. Se recomienda hidratar por 5 minutos previo a la adaptación para mejorar la manejabilidad. Se adapta a la forma del defecto.
- Si es necesario se indica una presutura para estabilizar la entrada y adaptación de la membrana.
- Reposición del colgajo sobre el defecto y sutura.
- Indicaciones y medicación postquirúrgicas.

www.bdigital.ula.ve

Condiciones imprescindibles para lograr el éxito tras la aplicación de una ROG

A juzgar por las evidencias científicas halladas, puede determinarse que se deben dar una serie de condiciones para que la neoformación ósea sea predecible cuando se utilizan técnicas de ROG¹:

- Debe existir una fuente de células osteogénicas. La ROG se basa en la presencia de hueso en el lugar del defecto o próximo a éste.
- Resulta asimismo esencial un correcto aporte vascular. Este aporte procede principalmente de la superficie ósea adyacente (canales haversianos y de volkmann y compartimientos medulares).
- La herida o el defecto debe permanecer prácticamente estable durante el proceso de regeneración.

- Un apropiado espacio debe ser creado y mantenido entre la superficie ósea y la membrana.
- Las células de tejido conectivo deben ser excluidas del espacio creado por la membrana que actúa como barrera semioclusiva pues debe poseer poros para la oxigenación del tejido y adhesión celular.
- Biocompatibilidad del biomaterial implantado.
- El biomaterial debe ser químicamente estable y/o biodegradable en productos no tóxicos.
- En caso de actuar como relleno en tejido óseo, el biomaterial debe ser completamente reabsorbible en un tiempo variable de 6 a 12 meses ya que será completamente sustituido por el hueso neoformado ⁷¹.
- Suficientemente estable para permanecer *in situ* al menos 16 semanas, tiempo necesario para que el hueso regenerado ocupe el espacio ⁷².
- Propiedades mecánicas y físicas (diseño, tamaño, forma) adecuadas a la finalidad que cumplirán.
- Bajo costo.
- Fácil manipulación.

La posibilidad de que un defecto óseo cure por sí mismo, está en relación directa con su tamaño. La regeneración ósea espontánea se limita a defectos en los que exista una distancia ósea pequeña. El criterio para la utilización de membranas depende básicamente del tipo de defecto, es decir el número de paredes residuales y tamaño. En este sentido, los defectos de tamaño crítico no son capaces de regenerar

espontáneamente; mientras que los de tamaño no crítico curan espontáneamente siempre que tengan intactas 4 paredes o cerrados⁴³.

Un defecto con paredes óseas conservadas (defecto cerrado) es decir en el cual solo falta una pared, puede cicatrizar solo o bien realizando un relleno óseo, sin que requiera una membrana para estabilizar el coágulo o el relleno, siempre que el área anatómica donde se ubique disponga de suficiente soporte óseo como para garantizar la estabilidad⁵⁸. No obstante, otros autores^{24, 25, 26, 27, 28,29} afirman que aún en defectos cerrados existen grandes posibilidades de invasión de componentes celulares (células epiteliales y conjuntivas) al defecto óseo, que interfieren con el proceso de regeneración.

Mientras que en los defectos abiertos, en los cuales no existe 2 o más paredes óseas, no es posible mantener la estabilidad del contenido del defecto, pues es fácilmente desplazado por los micromovimientos de los tejidos blandos^{56,26}, en estos casos se requiere de biomateriales que ayuden en el proceso de regeneración.

Para lograr este propósito los scaffolds o andamios se posicionan en un lugar importante, pues coincidiendo con Agrawal y col.⁴ estos bioandamios han demostrado resultados clínica, radiográfica e histomorfológicamente altamente similares a los procesos fisiológicos de regeneración ósea.

Estos dispositivos actúan de manera activa en el proceso de regeneración del tejido, lo cual induce la liberación de factores de diferenciación y crecimiento mientras que sintetizan su propia matriz extracelular, que proporciona un ambiente y arquitectura específicos del tejido y sirve como reservorio de agua, nutrientes, citocinas y factores de crecimiento, entre otros^{64,65}

Existen muchas alternativas de materiales, técnicas de procesamiento y uso en combinación con otras técnicas de ingeniería de tejidos. Lo primordial es entender cuáles son los procesos biológicos, físicos y químicos y cuáles son sus mecanismos dominantes para poder hacer un adecuado desarrollo y selección de materiales y

técnicas de fabricación de scaffolds para obtener implantes que sean sustitutos óseos útiles en aplicaciones clínicas.

Hasta el momento se ha observado controversia en cuanto a las ventajas de usar una estrategia u otra para ganancia de tejidos y algunos autores sentencian el uso de los biomateriales, añadiéndole desventajas como la posibilidad de aumentar la tasa de morbilidad y necesidad de esperar un tiempo mayor para obtener resultados. Pero nuevamente se debe enfatizar que algunos biomateriales ciertamente poseen desventajas, pero casi en su totalidad son los no reabsorbibles y de origen sintético, o bien los de origen animal. Sin embargo existen factores que pueden impedir la regeneración ósea, entre los que destacan: fallo en el aporte vascular, inestabilidad mecánica, defectos de considerables magnitudes, invasión del foco por tejidos con alta tasa de proliferación, reacciones adversas por falta de biocompatibilidad.

Finalmente no debe dejar de trabajarse en la producción de nuevas alternativas, pues lamentablemente todos los requisitos que debe poseer un biomaterial para que sea elegido al momento de practicar una ROG, han sido difíciles de obtener con las membranas disponibles en el mercado venezolano, puesto que no son totalmente biocompatibles, y las no reabsorbibles deben ser retiradas tiempo después de la cirugía⁸, ya que actúan como un apósito pasivo, es decir, no aportan ningún beneficio biológico adicional, sin mencionar el alto costo que implica su uso.

Tomando en cuenta los principios biológicos fundamentales de la regeneración ósea, las técnicas quirúrgicas apropiadas, un diseño adecuado del biomaterial y una selección cuidadosa de los pacientes, la ingeniería de tejidos tiene el reto de desarrollar scaffolds, que superen las mencionadas desventajas, que cumplan la funcionalidad del hueso e imite sus propiedades y proporcione un soporte temporal que ayude al proceso de regeneración ósea.

Quitina y Quitosano.

Dada la importancia que reviste el uso de biomateriales biodegradables, biocompatibles, y bioactivos a continuación se realiza una revisión de la literatura que describe los aspectos conceptuales más relevantes acerca del Quitosano, aminoglucósido que se perfila como excelente candidato para diseñar andamios con fines de implantación en la ROG.

En Odontología, el quitosano ha permitido desarrollar nuevas tendencias terapéuticas y preventivas, produciendo materiales totalmente biocompatibles y biomiméticos a base de componentes netamente naturales. Sin embargo, ha sido poco el uso que se le ha dado a causa del poco conocimiento que se tiene del mismo, es por ello que se plantea como una alternativa para la regeneración ósea guiada. Es probable que el quitosano sea uno de los polímeros más biocompatibles que hasta ahora se conocen.

El quitosano es un biopolímero natural derivado de la quitina, conocida como el segundo polisacárido más abundante del planeta, después de la celulosa (materia base del papel)^{10,11}, encontrándose comúnmente en la naturaleza tanto en el reino animal en el exoesqueleto de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos, cucarachas) y en el reino vegetal (paredes celulares de hongos, algas, entre otros).

En prudente recordar que un polímero (del Griego: poly: muchos y mero: parte, segmento) es una macromolécula (generalmente orgánica) formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros. La unión entre estas partes deriva de una reacción llamada polimerización. Así, la quitina está compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina), siendo éste último el monómero o parte que se repite en la cadena de la estructura química de la quitina. Éstos monómero o unidades se unen entre sí con enlaces β -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa⁷³, es decir lo une un polisacárido cuyas unidades de glucosa se unen por enlaces de tipo glucosídico. Los números 1, 4 indican la posición de los átomos de carbono en cada extremo del enlace.

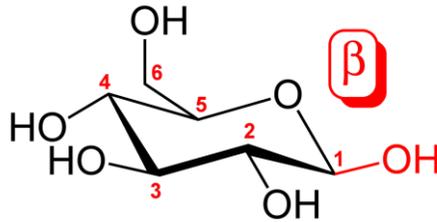


Figura 6. Numeración de los carbonos y numeración beta en la molécula de glucosa.

Tomado de: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-D-glucopyranose-2D-skeletal.png>

Así, puede pensarse que la quitina y la celulosa son en consecuencia polisacáridos muy parecidos en su composición química, pero su diferencia principal se encuentra en el carbono dos el cual presenta un grupo acetamida en la quitina, es decir un grupo acetilo (CH_3) unido a una amina (NH) (figura 8) y que en la celulosa está ocupado por un grupo hidroxilo (OH) (figura 7) ^{11, 13,74-77}. Este cambio permite un incremento de los enlaces de hidrógeno con los polímeros adyacentes, dándole a la quitina una mayor resistencia.

www.bdigital.ula.ve

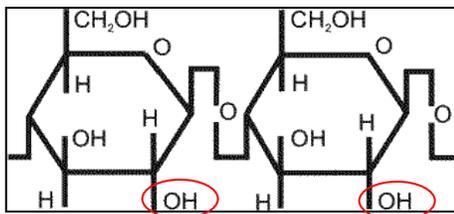


Figura7. Estructura química de la Celulosa.

Fuente:<http://www.cubasolar.cu/biblioteca/energia/Energia21/images/Molecula.gif>

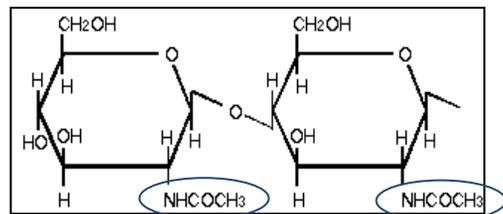


Figura8. Estructura química de la Quitina. Fuente:

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/ibc99/botanica/botanica/bw/quitina.gif>

El quitosano por su parte, es una macromolécula fibrosa, o polímero lineal derivado de la desacetilación extensiva de la quitina. Está compuesto por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena, la N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicos (figura 9), siendo nombrada químicamente: 2-Amino-2-Desoxi- β -D-Glucopiranososa. Como grupo visto de forma genérica, los polisacáridos desempeñan diversos e importantes roles dentro de la biología de los

procesos de la vida, sin embargo, muchas veces se les denomina bajo este título. Estas macromoléculas se pueden dividir en dos grandes grupos; los estructurales como celulosa, amilosa y para organismos vivos no humanos quitina y quitosano; y los de almacenamiento de energía como, dextrano, glicosaminoglicanos⁷⁵.

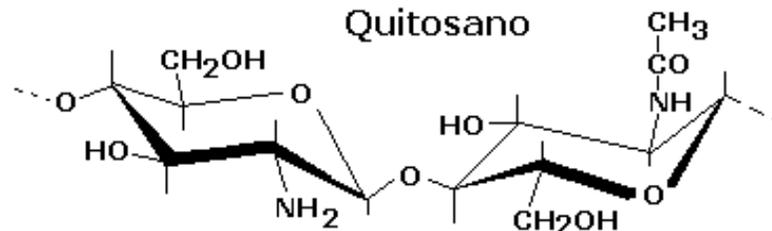


Figura9. Unidad repetitiva del Quitosano. Tomado de Lárez.¹²

Vale acotar que las técnicas de extracción de quitina y a partir de ella, el quitosano son muy variadas. La mayor parte de las técnicas requieren de proceso químicos de hidrólisis de la proteína y la remoción de la materia inorgánica. Actualmente se investigan tratamientos enzimáticos, usando “extractos enzimáticos o enzimas aisladas y fermentaciones microbiológicas, pero aún sin la eficiencia de los métodos químicos, fundamentalmente en lo que respecta a la eliminación del material inorgánico”⁷⁸

Sin embargo, otros autores⁷⁹ afirman que el método enzimático es mejor pues la degradación enzimática de los polímeros de quitosano posee una mayor efectividad, debido a que el curso de la reacción de hidrólisis y la distribución de los productos de ella, están sujetos a un mejor control, además de propiciar este método un rendimiento mayor de los productos de hidrólisis.

Tratamiento químico para la obtención del Quitosano.

Obtenido de caparazones de crustáceos, el tratamiento consistirá en básicamente 6 pasos a saber:

1. **Acondicionamiento de la materia prima:** lavado con agua de los caparazones a procesar y separación de la masa que pueda quedar adherida a los mismos.
2. **Molienda de la materia prima:** hasta el tamaño de partículas adecuado para la extracción, que generalmente es de varios milímetros.
3. **Desproteínización:** disolución de las proteínas. Se logra mediante inmersión del polvo molido de los caparazones de los crustáceos en una solución acuosa diluida de hidroxido de sodio (NaOH) a una temperatura que oscila entre 65-100 °C. El tiempo de tratamiento suele variar entre 0.5 y 72 horas. En ocasiones se prefiere realizar dos tratamientos consecutivos por tiempos cortos, teniendo en cuenta que tratamientos por largo tiempo o a temperaturas muy altas pueden provocar ruptura de las cadenas y la desacetilación parcial del polímero⁸⁰.
4. **Desmineralización:** eliminación del componente inorgánico CaCO₃ o carbonato de calcio, el cual se elimina empleando soluciones diluidas de ácido clorhídrico (HCl) hasta 10% a temperatura ambiente, la concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente, pero deben evitarse los tratamientos a temperaturas más altas, pues provocarían la degradación del polímero⁸⁰.
5. **Decoloración de la quitina** para retirar los pigmentos rojizos característicos de los caparazones de los crustáceos, principalmente astaxantina, la cantaxantina, el astaceno, la luteína y el β -caroteno. Suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de solventes⁸¹.

6. **La desacetilación o hidrólisis de la quitina** se lleva a cabo por hidrólisis de los grupos acetamida en medio fuertemente alcalino, a altas temperaturas. Generalmente la reacción se realiza en fase heterogénea empleando soluciones concentradas de hidróxido de sodio o de potasio (NaOH o KOH) en concentraciones entre 40-50%, a temperaturas superiores a 100°C, preferiblemente en atmósfera inerte. Este procedimiento debe repetirse, puesto que un solo tratamiento alcalino logra una desacetilación parcial, cuyo grado de desacetilación no pasa del 75 al 85%, y el grado de desacetilación mínimo esperado debe ser de más del 90%, y la desacetilación parcial, química o enzimática, en un medio alcalino.⁸² La secuencia del proceso se muestra en la figura 10.



Figura10.Diagrama resumen del proceso de obtención del quitosano. **Fuente propia.**

Caracterización físicoquímica del quitosano en relación a sus propiedades biológicas.

El quitosano es un biomaterial que posee numerosas propiedades biológicas de gran utilidad en el área de la salud, estas propiedades son adquiridas a través de la caracterización del material durante su proceso de obtención. Dentro de las características más importantes del procedimiento, resaltan principalmente el **grado de desacetilización** y el **peso molecular**, ya que estos dos parámetros físico-químicos, permitirán la diferenciación en la estructura del mismo, proporcionando al material con diversas cualidades^{74,75}, aunque existen otras formas de caracterización como la determinación del contenido de humedad y de cenizas.

Este polímero natural ha demostrado tener múltiples propiedades como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antimicrobiana, cicatrizante de heridas, efecto hemostático, antiviral, antitumoral e inmune-adyuvante¹⁰⁻¹³. Estas propiedades dependen directamente del **peso molecular (kDa)** y de su **grado de desacetilación**¹² y nos dan una idea de su alto potencial en aplicaciones en el campo de la ciencia y la tecnología.

El quitosano puede tener un peso molecular no superior a 5×10^5 g/mol, o peso molecular mediano. Aunque también existen productos de alto peso molecular. Este parámetro generalmente se determina por pruebas de viscosidad del activo.⁸³ El grado de desacetilación (gda) se refiere al contenido en grupos aminos presentes en la cadena polimérica. La composición de las cadenas de quitosano, como sus dimensiones, suelen variar dependiendo del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención, lo que incidirá en las propiedades del polisacárido. Clínicamente su implicación se puede apreciar en la forma cómo actúa el biomaterial en el organismo, de manera que siempre se procurará el mayor grado de desacetilación y mayor pureza en consecuencia.

El quitosano es relativamente reactivo y normalmente es insoluble en pH neutros y básicos, siendo soluble sólo en ácidos, sobre todo en ácidos orgánicos, presentando solubilidad limitada en ácidos inorgánicos ⁸⁴. Esta es otra de las cualidades importantes del biomaterial, su ***solubilidad del quitosano en soluciones ácidas diluidas***, como por ejemplo el ácido acético, potenciando sus propiedades biológicas, tales como su capacidad antiséptica ⁷⁶ y de regeneración de tejidos ^{74,75}. Su disolución se da lentamente en soluciones acuosas ácidas (en ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico y perclórico diluido) y ligeramente ácidas y tiene la característica de ser hidrofílico, reteniendo agua en su estructura, por lo cual tiene la capacidad de formar geles. ¹²

Esta solubilidad que lo diferencia de la quitina, que es insoluble, le da una gran versatilidad al polímero pues al solubilizarse en medios acuosos débilmente ácidos facilita su manipulación en condiciones suaves, hinchándose (Figura 11) para formar una solución de tipo hidrogel, solución madre de muchas presentaciones físicas. Katime y cols. ⁸⁵ definen a los hidrogeles como materiales poliméricos, en forma de redes entrecruzadas, que se caracterizan por tener una gran capacidad de absorción de agua, pero son insolubles en ella, cuando la absorben se hinchan, y aumentan considerablemente su volumen, pero mantienen su forma, son blandos y elásticos.



Figura11. Biogel de quitosano obtenido por disolución en ácido acético. Fuente propia.

Suárez y cols. ⁸⁶

Sin embargo esa solubilización del quitosano en ácido le confiere una carga negativa que no es favorable para interactuar con el sistema corporal. Es por ello que debe protonarse el material, esto es cargar la superficie del mismo de forma positiva o sus grupos amino ($R-NH_3^+$), mediante inmersión en un álcali, aumentando así la **capacidad mucoadhesiva** a los tejidos. Esta adhesión se explica porque la interacción de los grupos amino libre del quitosano cargados positivamente que se atraen y se unen a las cargas negativas de la membrana celular del epitelio⁷⁴. Esta misma interacción electrostática permite la unión a la estructura de proteínas del plasma y diferentes polianiones, como polímeros sintéticos, componentes de la matriz extracelular y ADN.

Debido a su alto peso molecular y a su estructura lineal no ramificada, el quitosano es un potente agente viscosizante en medio ácido y se comporta como un **material pseudoplástico o semejante a un hidrogel**, con viscosidad dependiente de la agitación. La **viscosidad** de las soluciones de quitosano aumenta al incrementar la concentración de éste, mientras que disminuye al elevar la temperatura y el grado de desacetilación del producto. Esto se debe a que **es capaz de formar policomplejos**, es decir, se une a otros polielectrolitos por atracción electrostática de cargas opuestas. En el caso del quitosano, por su naturaleza policationica, forma complejos con proteínas acídicas en una variedad de fluidos biológicos, los cuales pueden ser manipulados con relativa facilidad⁸⁷. Igualmente se ha logrado preparar una serie de policomplejos que tienen características de hidrogeles, motivo por el cual ha sido posible estudiarlos en la liberación controlada de drogas, incluyendo tratamientos anticancerosos⁸⁸.

Generalmente la obtención de hidrogeles (incluido el quitosano) por formación de policomplejos, reside en un proceso de hinchamiento del polímero en un medio ácido, resultado de una repulsión que ocurre entre los grupos cargados electrostáticamente, mediante una **reacción de polimerización a templado del ácido**, vía radicales libres en medio acuoso⁸⁹.

Los hidrogeles obtenidos a partir de quitosano presentan una buena biocompatibilidad, baja degradación y un procesamiento sumamente fácil; la capacidad de estos hidrogeles de hincharse y deshidratarse depende de la composición y medio en el cual se obtuvo el gel⁹⁰. Según Berger y cols.⁹¹ los hidrogeles de quitosano entrecruzados se clasifican como hidrogeles iónicos y covalentes. Estos últimos se dividen en tres grupos: quitosano entrecruzado consigo mismo, redes poliméricas híbridas y redes de polímeros interpenetrados.

Las principales interacciones que se presentan en este tipo de hidrogel corresponden a enlaces covalentes; pero incluso se pueden presentar otras interacciones como enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas, las cuales se forman entre unidades acetiladas del quitosano. No obstante entre mayor sea el grado de entrecruzamiento tienden a predominar los enlaces covalentes. Entre los agentes entrecruzantes más empleados se encuentran los dialdehídos como el glicoxal y glutaraldehído. La reacción para la obtención del hidrogel se da entre el grupo aldehído que forma un enlace imina covalente con los grupos amino primarios del quitosano⁹⁰.

Según Goncalves y cols.⁹² el **grado de entrecruzamiento** es el principal parámetro que influencia en las propiedades de resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, con relación al peso molecular, además de brindar una estructura porosa al hidrogel cuya intención es fungir como andamio para regeneración de tejidos. Esta se encuentra influenciada por ciertos parámetros como la concentración del agente entrecruzante, peso molecular y grado de desacetilación del quitosano y temperatura.

Por otra parte, las sales de quitosano (con glutamato o cloruro) son solubles en agua, siendo la **solubilidad dependiente del grado de desacetilación** del quitosano. Así, con bajo grado de desacetilación, llega a ser soluble hasta pH = 9, mientras que con un grado de desacetilación alto es soluble hasta pH = 6,5. La solubilidad también se encuentra influenciada por la adición de sales a la solución, viéndose que al aumentar la fuerza iónica del medio, menor es la solubilidad⁹³. Esto se debe, a que el

quitosano en solución, tiene una conformación extendida al repelerse las cargas (+) desacetiladas de cada unidad, de las unidades de glucosamina vecinas. Al adicionar electrolitos se reduce este efecto, dando una conformación en espiral al azar. Si se aumenta mucho la concentración de electrolitos en el medio, habrá una sobresaturación, dando lugar a la precipitación del quitosano desde la solución ⁹⁴.

El quitosano, podría considerarse como un polímero natural, catiónico, de origen heterólogo, que tienen la habilidad y ventaja de ser **degradado por las enzimas** que se encuentran en el organismo humano, es decir, es biodegradable por la lizozima y otras enzimas proteolíticas, porque tiene una estructura similar a las sustancias macromoleculares que el medio biológico es capaz de reconocer, metabolizar y así se evita el problema de toxicidad y de respuesta inflamatoria. La velocidad de degradación puede controlarse, mediante modificaciones químicas permitiendo así el diseño con determinado grado de duración ^{10, 11,13,74-77}.

Aunque el quitosano es una molécula totalmente ausente en mamíferos, sus unidades estructurales sacarídicas, la glucosamina y la N-acetil-glucosamina, están presentes en diferentes glicosaminoglicanos (GAG), que a su vez se encuentran en la matriz extracelular y juegan un papel muy importante en su organización y funcionamiento. El quitosano es, por tanto, un compuesto análogo a los GAG, y eso le confiere alguna de sus actividades biológicas como la **biocompatibilidad**.

Los GAG son polisacáridos aniónicos, unas estructuras glucídicas, que se encuentran en formas solubles o unidas covalentemente a núcleos proteicos formando proteoglicanos (PG). Se trata de un tipo de biomoléculas de función estructural presentes fundamentalmente en el tejido conectivo, epitelial y óseo, así como en el medio intercelular. Los más habituales son la N-acetilglucosamina o la N-acetilgalactosamina. Algunos glicosaminoglicanos relevantes son el ácido hialurónico presente en el tejido conjuntivo, cordón umbilical, humor vítreo, líquido sinovial, vasos sanguíneos y cartílago. El sulfato de heparina (o heparán sulfato), localizada en hígado, pulmón y piel. El sulfato de condroitina (o condroitín-sulfato)

importante en tejidos óseos y cartilagosos. El sulfato de queratina (o queratán sulfato) en la córnea, discos intervertebrales.⁹⁵

En los tejidos, estos PG se localizan intracelularmente (en gránulos secretorios), en las superficies celulares, en la matriz extracelular y en las membranas basales⁹⁶. Todos los GAGs, excepto Heparina que se encuentra intracelularmente en mastocitos del tejido conectivo y otras células hematopoyéticas que participan en la respuesta inmune e inflamatoria, están presentes como PG en la matriz extracelular, donde participan principalmente en procesos de difusión de moléculas hidrosolubles, migración, proliferación y adhesión celular. También en superficies celulares han sido descritos PG principalmente en células epiteliales y fibroblastos e inclusive en células nerviosas⁹⁷. Estos PG participan en interacciones célula-matriz extracelular, adhesión célula-célula y señalización celular. En sangre sólo se encuentran pequeñas cantidades de GAGs, en plasma y en células sanguíneas como plaquetas y leucocitos⁹⁸.

En tejido epitelial y otros tejidos conjuntivos es muy importante la interacción que se da entre el quitosano y los GAG o PG, para inducir a ciertas células como los fibroblastos que produzcan los elementos fundamentales como el colágeno. Esta estimulación también es posible gracias a la diferencia entre la carga del quitosano carga positiva a pH ácido, por lo que puede interaccionar con la superficie celular y proteínas plasmáticas de manera singular, combinando interacciones específicas tipo GAG con otras inespecíficas asociadas a su carga⁹⁹; de allí las acciones **hemostática e inmunomoduladora del quitosano**.

Adicionalmente, el grado de desacetilización unido al peso molecular y al contenido de agua presente en el gel, permite modificar no sólo su presentación física, sino también la velocidad de **biodegradación o su hidrólisis**, en consecuencia permite controlar la liberación prolongada del principio activo del material. Además, el carácter policationico le confiere al quitosano alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (p. ej. insulina, ADN, ARN, heparina.) y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica. Estos dos

comportamientos han sido utilizados para la **liberación prolongada de aditivos**, ya que el quitosano tiene la capacidad de abrir las uniones estrechas entre las células epiteliales, facilitando el transporte de fármacos a través del epitelio ^{74, 75}.

Por la versatilidad que le confiere su estructura química, a partir de su forma de hidrogel cuenta con la habilidad de **formar estructuras porosas** con poros interconectados, útiles en la preparación de **micro partículas o liposomas** para ser aplicado como scaffold o andamio en la ingeniería de tejidos, constituyendo una alternativa muy novedosa e interesante frente a los demás tipos de estructuras tridimensionales utilizadas con este fin, puesto que además de servir como **soporte en el cultivo celular** también sirve como sistema de liberación controlada de moléculas bioactivas ¹⁰⁰.

Liposoma y membrana de quitosano.

En función de estas pruebas fisicoquímicas y el comportamiento del quitosano en ciertas condiciones se ha logrado derivar diferentes presentaciones físicas o formulaciones con grandiosas propiedades biomédicas. Este se convierte en un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas o biomembranas, hidrogeles, andamios porosos, polvo, cremas, fibras, micro y nanopartículas, y en el caso que atañe en esta investigación, en **membrana y liposoma**.

La membrana de quitosano se refiere a una biopelícula elaborada a base de una solución de quitosano en forma de hidrogel sometida a un proceso de desecación, que será objeto de implantación corporal con fines regenerativos. Abarrategui ¹⁰¹ recalca que los filmes de quitosano indican que estos poseen propiedades adecuadas para su uso en regeneración tisular. Por un lado, el espesor del filme es modulable y directamente proporcional a la cantidad de quitosano utilizada para su formación. Por otro, los parámetros de rugosidad superficial, hidratación e hidrofiliidad corresponden a un material con capacidad para la adhesión celular. Esta adhesión celular explica la biocompatibilidad del biomaterial en forma de biopelícula, pues las células se adhieren y proliferan sobre los filmes de quitosano (figura 12).

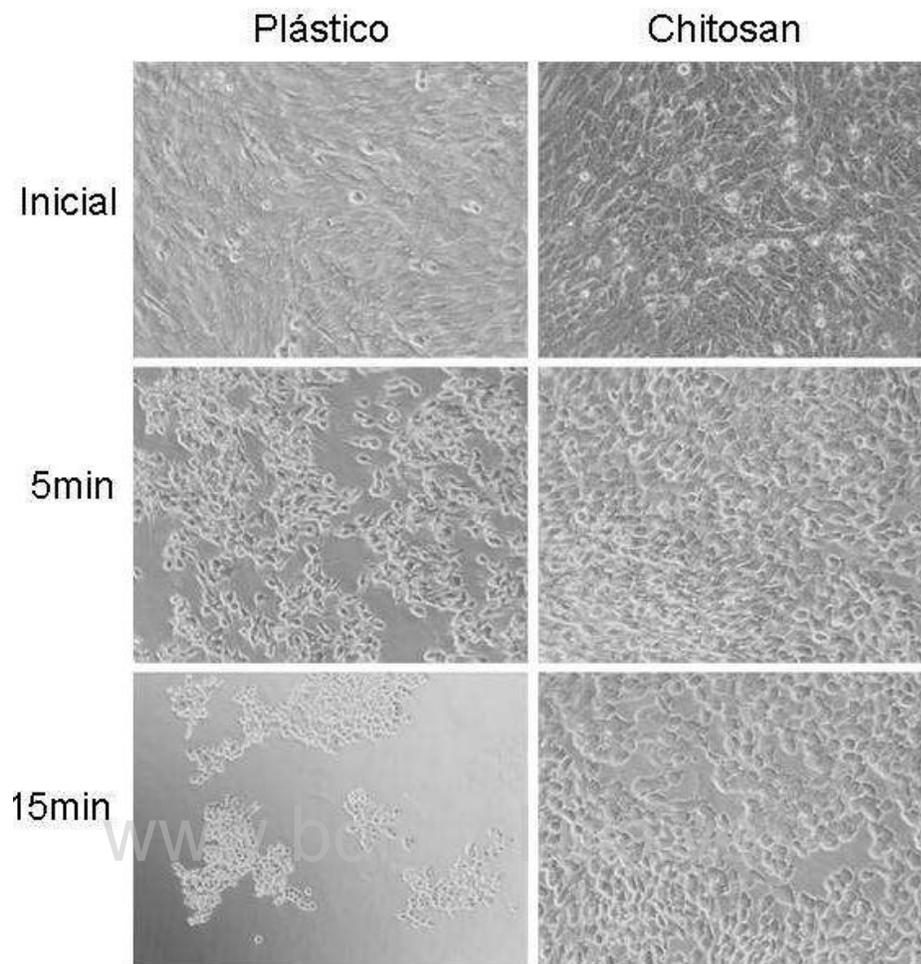


Figura 12. Adhesión y proliferación celular en biopelículas de quitosano y en otro polímero. Tomado de Abarrategui ¹⁰¹

En la efectividad de las biopelículas o membranas, además de otros requerimientos ideales de un andamio, señaladas en el apartado de regeneración ósea, son vitales la estructura porosa y la composición del material con el cual se elaboran las biopelículas. Estos dos requisitos cumplen roles determinantes en las características del proceso de filtración y adhesión celular por los poros de las membranas¹⁰² (figura 13) .El entrecruzamiento modifica algunas propiedades del material, por ejemplo mejora su resistencia mecánica con lo cual en el caso de las membranas, le permitiría soportar mayores presiones. La elasticidad, solubilidad y fluencia del material dependerán del grado de entrecruzamiento alcanzado.

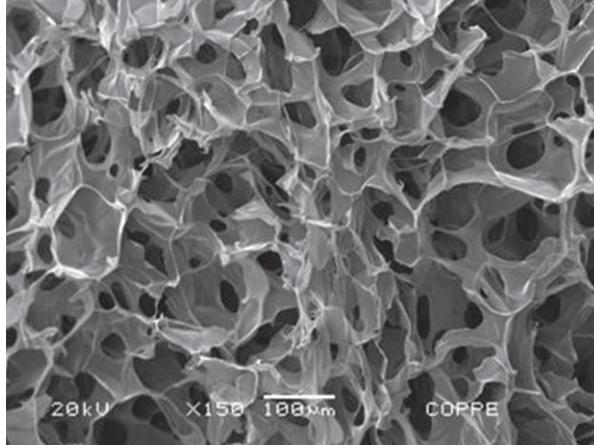


Figura 13. Microfotografía electrónica de barrido de andamio de quitosano. 150×. **Tomado de Mulder** ¹⁰²

Otra forma de reforzar la función de un andamio que se ha utilizado con afortunado éxito, es la utilización de sistemas nanoparticulares. Sin embargo la presentación de liposoma es su forma más simple y de un tamaño mucho mayor. Generalmente al referirse a liposomas se trata de nanopartículas o vesículas sencillas en las que una membrana formada por moléculas lipídicas, mayoritariamente fosfolípidos, encierran un compartimiento acuoso interno ¹⁰³

Estas vesículas preparadas a partir de los lípidos se han utilizado como posibles portadores de fármacos debido a la protección que pueden ofrecer a los activos que se encuentran en su núcleo. ¹⁰⁴ Generalmente se obtienen por dispersión de un líquido en un medio acuoso, líquido que es hidrofóbico y al contactar con el medio de dispersión crea repulsión, tal como sucedería en una dispersión de aceite en agua. (Figura 14)

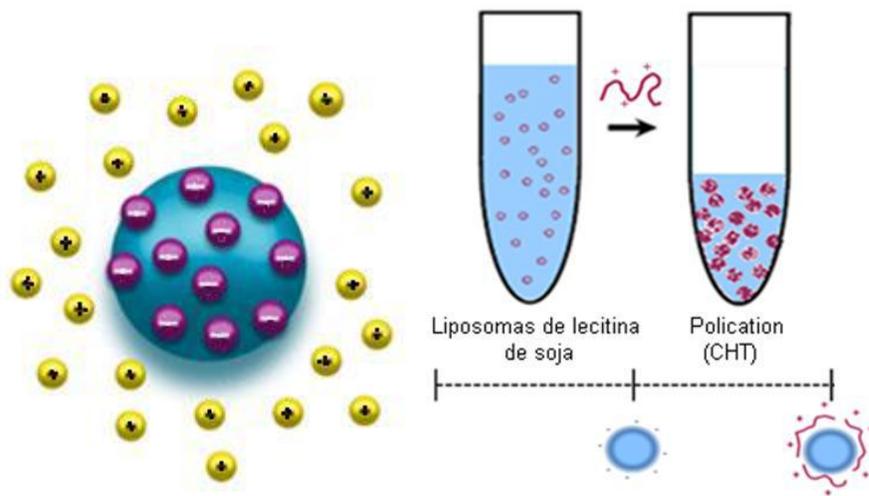


Figura 14. Representación de un sistema liposomal estabilizado por deposición electrostática y la metodología empleada para preparar los sistemas estabilizados con quitosano. **Modificado de Ramos y col.** ¹⁰⁵

La técnica bajo la cual se preparan estos sistemas liposomales, puede definirse como encapsulación. Bajo ésta técnica gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa¹⁰⁶, esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con cadenas para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas¹⁰⁷. La estructura formada por el agente microencapsulante alrededor de la sustancia microencapsulada (núcleo) es llamada pared, esta protege el núcleo contra el deterioro y liberación bajo condiciones deseadas, y la técnica aplicada es el atrapamiento en liposomas¹⁰⁸. El quitosano cumple con la premisa de ser biocompatible y biodegradable (Figura 15), lo que lo convierte en un buen candidato para la producción de vesículas liposomales estables y bioadhesivas, como se demostrara en trabajos previos^{109,110}.

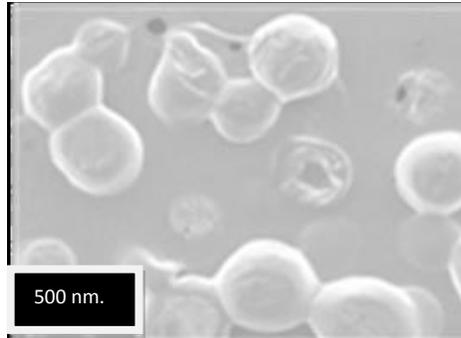


Figura 15. Visualización por microscopía electrónica de transmisión de la morfología de nanovesículas liposomales recubiertas con biopolímero quitosano. **Modificado de Ramos y cols.**¹⁰⁵

Principales usos biomédicos del quitosano.

Uno de los principales cánones de los investigadores avocados a la bioingeniería y los biomateriales ha sido trabajar con materiales de origen natural, en vista de la gran similitud biológica, química y física que presentan comparativamente con los tejidos humanos, lo que implica indiscutiblemente menor agresividad traduciéndose así en una respuesta adecuada del sistema inmune, lo idealmente esperado. En resumen, la aplicación de estos materiales en el campo biomédico conlleva la formación de una interface con el sistema biológico, que requiere alta biocompatibilidad. En consonancia con esta premisa, el quitosano ha demostrado múltiples propiedades biológicas que han fomentado su uso en medicina.

El uso del quitosano se remonta a la antigüedad en donde se utilizaba para acelerar el saneamiento de heridas. Los antepasados de los coreanos usaban la quitina en el tratamiento de abrasiones, los mexicanos aplicaban quitosano para la aceleración de la cicatrización de heridas. Actualmente, entre los usos más sencillos del quitosano relacionados al tratamiento de las heridas caben mencionar: producción

de suturas quirúrgicas a partir de quitina, producción de gasas y vendajes tratados con quitosano, cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras ^{111,112}. Hoy en día múltiples estudios demuestran su versatilidad, nada más en la década pasada se expandió el uso del quitosano en el desarrollo de sistemas regenerativos. Higuera y cols.¹¹³ destacan que más del 50% del número total de solicitudes de patentes registradas en 2006 que reivindican el uso de este biopolímero en relación con la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas (e.g. parches cicatrizantes HemCon®).

Otro efecto que destaca del quitosano es su acción reepitelizante y regenerante de nervios en la dermis vascular de piel por injerto proveniente del donante ¹¹⁴. Específicamente su función como cicatrizante de heridas se debe a una disminución de la fibrosis, promueve la síntesis del colágeno no cicatrizal¹¹⁵, reduciendo la formación de cicatrices debido a que incrementa la acción de queratinocitos, leucocitos polimorfonucleares, neutrófilos, fibroblastos y macrófagos ¹¹⁶, y en consecuencia regenera las heridas en diversos tejidos.

El quitosano se comporta como acelerador de la cicatrización de heridas al incrementar las funciones de las células inflamatorias e inmunes. Entre estas células y sus funciones se encuentran los leucocitos polimorfonucleares (fagocitosis, expresión de osteopontina y liberación de leucotrieno B4), macrófagos (fagocitosis, producción de IL-1, producción del factor de crecimiento b1 transformante y producción de plaquetas derivadas del factor de crecimiento) y fibroblastos (producción de IL-8)¹¹⁷

Adicionalmente, esta actividad se ve potenciada por su efecto hemostático, provocado por la interacción entre la membrana celular de los eritrocitos y el quitosano, siendo esta interacción independiente de la cascada clásica de la coagulación.^{118, 119}

La quitina y el quitosano son biocompatibles, en las ratas de laboratorio se ha reportado una dosis tóxica de 16g/Kg del Quitosano. Es decir, su toxicidad es cercana a la de la sal y el azúcar, lo cual afirma que éste biomaterial puede ser utilizado como

excipiente de uso farmacéutico aprovechando sus acciones biológicas o farmacológicas, sin efectos adversos ¹²⁰. Kojima y cols. ⁹⁹ explican la razón por la cual biológicamente el quitosano es compatible. Esto se sustenta en el entendido que aunque el quitosano es una molécula totalmente ausente en mamíferos, sus unidades estructurales sacarídicas, la glucosamina y la N-acetil-glucosamina, están presentes en diferentes glicosaminoglicanos (GAG) que se encuentran en la matriz extracelular y juegan un papel muy importante en la organización y funcionamiento celular. El quitosano es, por tanto, un compuesto análogo a los GAG, y eso le confiere alguna de sus actividades biológicas. Además, a diferencia de los GAG, el quitosano presenta carácter básico y carga positiva a pH ácido, por lo que puede interaccionar electrostáticamente con la superficie celular y proteínas plasmáticas de manera singular.

Además, es importante remarcar que el quitosano es un polímero de estructura tridimensional, que se expande en presencia de agua o fluidos biológicos, posee actividad inmunológica, solubilidad, bioactividad y es biodegradable ya que puede ser hidrolizado por las lisozimas, presentes en los fluidos corporales. Debido a estas propiedades, se ha utilizado para la liberación controlada de fármacos, como hipocolesterolemizante, antimicrobiano, anticariogénico, coagulante, coadyuvante para la regeneración ósea y muchos más ¹³.

Entre los usos farmacéuticos más comunes del quitosano se pueden citar su acción aglutinante, disgregante y como polímero para recubrimiento. Asimismo, se puede aplicar como excipiente capaz de proporcionar liberación controlada de fármacos en sistemas hinchables y debido a su capacidad de formar geles, se le están atribuyendo nuevos usos como modulador de la liberación de genes y péptidos para administración oral, para aumentar la absorción de éstos ¹³.

Dentro de las numerosas aplicaciones biológicas, médicas y tecnológicas resalta su papel en la ingeniería de tejidos, popularizado por ser altamente útil para el tratamiento de reconstrucción de la piel, convirtiéndolo en una película súper delgada que sirve como soporte para las células epiteliales y, que por medio de sus

características humectantes y antibacteriales, sea útil para personas con quemaduras graves o con problemas de la piel ⁵⁶.

En los últimos 20 años, el quitosano ha sido utilizado como un excipiente seguro en formulaciones de drogas, como un excelente mucoadhesivo y como un polímero natural bioadhesivo, que puede adherirse a los tejidos duros y blandos. Es aplicado en odontología, ortopedia, oftalmología y en procedimientos quirúrgicos. A continuación se agrupan sus principales aplicaciones.

Hipocolesterolemiante.

El quitosano independientemente del peso molecular, presenta efecto hipocolesterolemiante. Es por ello que su administración con ácido ascórbico produce una disminución de la grasa absorbida, pero entre mayor sea el grado de desacetilación del quitosano empleado, mayor es la viscosidad, así como también mayor es su acción sobre la absorción de las grasas de la dieta ^{13,120,121}.

Este mecanismo de acción se da gracias a que el quitosano al entrar en contacto con el pH del estómago, se gelifica y ese gel atrapa los lípidos ubicados en el intestino dificultando su absorción. Al combinar este biomaterial con ascorbato sódico, aumenta su capacidad gelificante y su flexibilidad, obteniéndose a su vez un incremento del poder de atrapar los lípidos que están en el tracto digestivo ¹²⁰. Como consecuencia de este efecto, se inhibe la formación de placas de ateroma, disminuyendo el riesgo de arterosclerosis en individuos con hipercolesterolemia ^{122,123}. Comparando el efecto del quitosano con la colestiramina (un hipocolesterolemiante ampliamente usado), se observó que ambos reducían el colesterol sérico y el colesterol hepático, pero el quitosano no produce deterioro de la mucosa intestinal y la colestiramina sí ¹²³.

Jing y cols ¹²⁴ sugieren el uso de quitosano en el tratamiento de pacientes con fallo renal, al observar la disminución en los niveles séricos del colesterol, aumento en los niveles de hemoglobina y una reducción significativa en las concentraciones séricas de urea y creatinina en pacientes sometidos a hemodiálisis luego de una

administración de 1350mg de quitosano, 2 veces al día después de 4 semanas de tratamiento.

Hemostático.

Ocurre una interacción entre la membrana celular de los eritrocitos y el quitosano, siendo ésta independiente de la cascada clásica de la coagulación. El quitosano microcristalino se puede usar como hemostático ^{118,119}, dando una reducción en el tiempo de compresión normal en arterias ¹²⁵. (Figura 16)

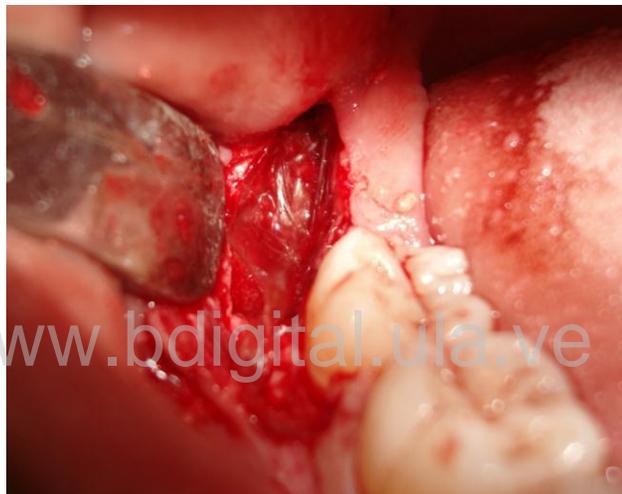


Figura 16. Efecto hemostático inmediato de una herida alveolar postexodoncia al contacto con membrana de quitosano. **Fuente propia.** Suárez y cols.⁷

Osteoinducción.

El quitosano ha sido descrito como promotor en la formación de hueso, las células madre mesenquimatosas cultivadas en presencia de este biomaterial, han demostrado una diferenciación de osteoblastos, comparado con los cultivos en ausencia del mismo^{14,15,126}.

Curación de Heridas.

La estructura química del quitosano es muy parecida a la del ácido hialurónico, el cual está presente en el tejido conjuntivo. A partir de esta afirmación, se han desarrollado estudios *in vitro* e *in vivo* por varios investigadores^{10,12-14,117,126,127}; incluso se ha producido quitosano para su uso veterinario, encontrando que este polímero acelera la curación de la herida, la frecuencia del tratamiento decrece y da protección a la superficie de la herida sin dolor¹⁶.

Las propiedades adhesivas, antifúngicas, bacteriostáticas y la permeabilidad al oxígeno, permiten que este biomaterial sea un excelente candidato para la aplicación tópica en el tratamiento de heridas y quemaduras^{128,129,130}.

Existen estudios sobre el quitosano que reportan la acción reepitelizante y regenerativa de nervios en la dermis vascular de piel¹²⁵, así como también la capacidad de reducción de actividad ulcerogénica sobre la mucosa gástrica, causada por el uso de fármacos AINEs (estudio realizado en ratas albinas). Esto sucede ya que este biopolímero se disuelve en el medio ácido del estómago y por sus propiedades demulcentes protege la mucosa estomacal¹³¹. Además, se ha comprobado que disminuye la fibrosis y la mortalidad en cirugía genitourinaria¹³⁰.

Actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana del polímero puede deberse a una interacción entre el quitosano y la pared celular de las bacterias, produciendo una alteración electrostática en la permeabilidad de la membrana bacteriana¹²⁸. Estudios sobre la acción antimicrobiana de diversos tipos de quitosano, han comprobado que puede ser activo frente a determinados microorganismos, tales como *Candida albicans*, *Escherichia coli* y diversas especies de *Aeromonas* y *Vibrio*^{13,128}.

El quitosano también previene la adherencia del *Streptococcus mutans* a la hidroxiapatita dental, principal responsable de la caries dental. Regenera los tejidos blandos orales, protege de los efectos de los ácidos orgánicos y posee efectos bactericidas, por lo que es posible añadir quitosano en pequeñas cantidades en pastas de dientes, chicles y colutorios bucales¹³².

Además de poseer características que ayuden a cicatrizar los tejidos, es importante encontrar en un biomaterial la propiedad de controlar cualquier infección de la herida. El quitosano ha demostrado ser capaz de impedir la proliferación bacteriana en el tratamiento de heridas infectadas^{13,128,126}. Su actividad antibacteriana se ha estudiado contra varias bacterias y hongos específicos, y esta actividad es influenciada por el grado de polimerización y algunas propiedades físicas y químicas^{10,128,15,126}.

El quitosano inhibe el crecimiento de bacterias de manera eficaz, pero dichos efectos están directamente relacionados con el peso molecular y el tipo de bacteria. Este biomaterial ejerce su efecto más potente contra gram-positivos que con los microorganismos gram-negativos y su mayor actividad se encuentra en los niveles bajos de pH, (pH entre 4.5-5.9)¹²⁶.

Terapia de Regeneración Tisular.

El quitosano posee cationicidad, lo que está asociado a las respuestas biológicas; además, su facilidad de manipulación, sus propiedades biodegradables y biocompatibles, hacen que éste sea un candidato excelente para este fin. De la misma manera, es un buen material que soporta los andamiajes en los que van a crecer las células, interactuando favorablemente con las mismas y con el medio, permitiendo la completa regeneración del tejido¹²⁶. A continuación se presentan otros de los usos más populares del quitosano (Figura 17)



Medicamentos para bajar de peso.

Fórmulas cosméticas para la piel y el cabello

Dentífrico con Quitosano

Figura 17. Algunos productos del quitosano de uso cosmeceútico disponibles en el mercado

Usos del quitosano en odontología.

Se han reportado numerosos estudios donde se ha utilizado éste biomaterial en las ciencias odontológicas debido a las propiedades previamente descritas, sin embargo, son investigaciones recientes. Dentro de los usos encontrados en la literatura se mencionan:

- **Antibacteriano:** este efecto se ha sido estudiado tanto en una investigación en la cual se agregó quitosano dentro alginato (material de impresión); demostrando una excelente respuesta antimicrobiana para en *E.coli* y *S. aureus*¹³³, como en la prevención de la formación de placa dental, hasta por 4 días y disminución de la adherencia de *S. mutans*, y *S. sanguis* a la hidroxiapatita dental, los cuales son microorganismos causantes de la caries dental¹³⁴. Además se reportó una combinación de un colutorio bucal de quitosano al 0,2% con Clorhexidina al 0,12% demostrando ser una combinación sinérgica para evitar la formación de placa dental¹⁴⁵, afirmando la posibilidad de añadir quitosano en pequeñas cantidades a las pastas dentales y enjuagues bucales¹³⁵. De igual manera se puede usar de gomas de mascar con quitosano para inhibir el número de bacterias cariogénicas, proponiendo así ser un método efectivo para el control de la placa dental y prevención de la caries¹³⁶. Conjuntamente el quitosano ha sido utilizado en nanopartículas, para ser mezclado con el cemento de óxido de zinc, en el área de endodoncia, para mantener la desinfección del conducto sin alterar el sellado del canal radicular¹³⁷.
- **Antifúngico:** se ha estudiado el efecto del quitosano frente a la *Candida albicans*, el cual es uno de los microorganismos patógenos más frecuentes de la cavidad bucal¹³⁸. Este estudio permite considerar al quitosano como

una alternativa terapéutica de la Estomatitis Subprotésica⁹⁰.

- **Efecto hemostático:** se estudió y se plantea que su mecanismo de acción es una interacción directa entre la membrana celular de los eritrocitos y el biomaterial, independiente de la cascada clásica de la coagulación, produciendo excelentes resultados en cuanto a la reducción del tiempo de coagulación en heridas producidas en lenguas de conejos heparinizados por la aplicación tópica de quitosano¹¹⁸.
- **Liberación controlada de fármacos,** como tratamiento para la periodontitis a través de microcápsulas de alginato recubiertas con una capa de quitosano, cargadas con un antibiótico llamado minociclina,. Estas microcápsulas demostraron una vida útil de 7 días, y un descenso estadísticamente significativo de las bacterias patógenas causantes de la enfermedad, como es el caso de la *Prevotella intermedia*¹³⁹. De la misma manera hay estudios sobre sistemas mucoadhesivos a base de quitosano destinados a la administración de calcitonina, nifedipina y propranolol e insulina a nivel de la mucosa bucal¹⁴⁰. Igualmente, se ha reportado el uso del quitosano para la liberación controlada de clorhexidina (agentes desinfectantes), en el canal radicular¹⁴¹. El quitosano forma nanopartículas que pueden atrapar a las drogas, propiedad que se ha utilizado para desarrollar una vacuna, formada por unas microesferas de ácido poli (láctico-co-glicólico) cubierta por este biomaterial, el cual es considerado potencialmente útil para liberar el antígeno de la caries dental¹⁴².
- **Regeneración Ósea Guiada (ROG):** se describe un estudio donde se utiliza el quitosano en el cultivo, transporte, fijación y desarrollo de

osteoblastos, en cuyos resultados se refleja una preferencia por el uso de membranas de quitosano debido a su mejor fijación en superficie y progreso ³⁶. La osteoregeneración mediante el uso de membranas de nanofibras de quitosano, ha sido estudiada exitosamente, demostrando ausencia de reacción inflamatoria ³⁴. Asimismo, se describe el rol del quitosano para reforzar el cemento de fosfato de calcio (material de relleno óseo en odontología), demostrando la modulación, proliferación y diferenciación de células madres en la regeneración ósea ¹⁷. Semejante a este, se realizó una combinación de quitosano con polvo de dentina y se evaluó su actividad osteogénica, demostrando la formación de hueso a los 4 días con mayor cantidad de hueso en estos soportes, en comparación con los que no contenían quitosano ³⁷. Además, éste biomaterial puede ser adicionado en la superficie de implantes de titanio, así como también puede ser utilizado para inducir la regeneración de los tejidos periodontales en periimplantitis ^{143,144}.

- **Regeneración Tisular Guiada (RTG):** Ha sido reportada, la combinación de quitosano con plasma rico en plaquetas para la regeneración de tejidos periodontales, lo cual comprobó una mejor y más rápida respuesta del tejido *in vivo* ¹⁵.
- **Otros:** Por otra parte, se han modificado algunos biomateriales dentales restauradores de uso convencional, como es el caso del ionómero de vidrio al cual se le agregó quitosano, observando que al terminar el estudio hubo un aumento y mejora en el módulo flexural del cemento y una acción catalizadora moduladora para la liberación de fluoruros ¹⁴⁵. También se han realizado estudios de otras membranas de Quitosano para cultivo y conservación de células de pulpa dental, las cuales fueron preparadas a -5 °C mostrando un éxito en el cultivo celular, al cabo de 30 días ¹⁴⁶. De igual forma, se reporta el uso directo del quitosano, para

realizar recubrimientos pulpaes, como forro cavitario para regenerar pulpa dental irritada, exhibiendo dentina reparativa a los 7 días del contacto. Estos resultados fueron comparados con el uso del hidróxido de calcio, obteniendo mejores resultados con el quitosano ¹⁴⁷.

Incluso, se ha estudiado exitosamente el uso de una inyección de 1ml de quitosano al 2% en la articulación temporomandibular para corregir el desplazamiento anterior del disco articular, aumentando la apertura bucal a tan solo 14 días de su implantación ¹⁴⁸. En la tabla 5 se resumen las principales aplicaciones odontológicas del quitosano.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 5. Resumen de las aplicaciones odontológicas del quitosano.

Propiedad	Acción biológica	Aplicación odontológica
Antibacteriano	<i>Inhibe: E.coli y S. aureus ,S. mutans, y S. sanguis</i>	Anticariogénico, desinfección del conducto sin alterar el sellado del canal radicular
Antifúngico	<i>Inhibe a Candida albicans</i>	Alternativa terapéutica de la Estomatitis Subprotésica
Hemostático	Interacción directa entre la membrana celular de los eritrocitos	Aplicación tópica para heridas del epitelio bucal
Liberación controlada de fármacos	Liberación de Nanopartículas mucoadhesivas vía transepitelial. Liberación controlada con micropartículas para colocación intradental, e intraósea.	Periodontitis, desinfección del conducto radicular, vacuna anticaries
Regeneración Ósea Guiada (ROG)	Cultivo de osteoblastos en membranas de quitosano. Actividad osteoinductora in vitro e in vivo	Periimplantitis Defectos óseos periodontales Combinación con otros componentes para relleno óseo Recubrimiento de implantes dentales
Regeneración Tisular Guiada (RTG)	Actividad osteogénica Regeneración de tejidos periodontales. Recubrimiento pulpar, Cultivo de células de pulpa dental Lubricación de la Articulación temporomandibular (ATM)	Peridontitis Pulpitis Disfunción del disco interarticular de la ATM

Fuente propia.

CAPÍTULO III

Marco Metodológico

El presente capítulo establece las consideraciones metodológicas del trabajo especial de grado, su diseño y nivel investigativo, las variables del estudio, identificación de la muestra, los aspectos bioéticos, las técnicas e instrumentos de recolección de datos empleados, el instrumental y el procedimientos que se llevaron a cabo durante el experimento y por último, las pruebas estadísticas que se empleadas para constatar el logro del objetivo planteado.

www.bdigital.ula.ve

Tipo y diseño de investigación

De acuerdo al nivel de profundidad con el cual se abordó el problema propuesto, el presente estudio se clasifica como de tipo descriptivo, siguiendo al taxonomía de Hurtado¹⁴⁹, ya que se limitó a observar, registrar, analizar e interpretar las reacciones y efectos del quitosano sobre la regeneración ósea, sin analizar o explicar causalidad, es decir, solo caracterizando el evento en estudio.

Correlativamente esta investigación se ajusta al diseño experimental descrito en la clasificación de Arias¹⁵⁰, porque la estrategia abordada para lograr el objetivo requería que un grupo de la muestra, el experimental fue tratado con el biomaterial que actuó como un estímulo o variable independiente, para observar la respuesta del tejido óseo (variable dependiente) ante la implantación del mismo. Específicamente se trata de un ensayo preclínico in vivo realizado en animales de laboratorio.

Muestra.

Estuvo constituida por 25 Ratas de laboratorio machos, del linaje Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), de 4-5 meses de edad, con un peso comprendido entre 300gr-350gr , provistas por el Bioterio de la Universidad de los Andes-Mérida (BIOULA). En estos animales se observó este fenómeno en cada una de las 50 tibias, es decir el grupo experimental estuvo formado por 25 tibias derechas y el control 25 tibias izquierdas. La selección de la muestra estuvo determinada por los criterios éticos establecidos por el bioterio en cuanto al empleo del menor número posible de animales y usando un muestreo por conveniencia ajustado a los criterios anteriormente descritos, por ende la muestra se clasifica como no probabilística¹⁵⁰.

La identificación de los animales que conformaron los grupos a evaluar en cada una de las semanas se realizó por marcaje de la cola en aros de diferentes colores para cada grupo, y durante el período experimental, se mantuvieron en jaulas individuales y luego en tres grupos: al grupo de animales a los que se les realizó la primera evaluación (semana 3), el grupo de la segunda evaluación (semana 6) y el de la tercera evaluación (semana 9).

Las ratas Wistar se seleccionaron como modelo animal en este estudio, ya que ofrecen ventajas en comparación con los ratones (mayor tamaño y peso corporal), lo que facilita su manipulación para realizarles la cirugía en tibia. Igualmente, en estas cepas no consanguíneas de esa edad, el hueso de la tibia que es similar al hueso maxilar se encuentra en estado maduro, presentando un parecido biológico con los humanos en cuanto a los procesos de regeneración ósea¹⁵¹. En consecuencia, los resultados obtenidos a partir de este experimento pre-clínico, se podrían extrapolar para ser aplicados en pacientes.

Sistema de variables.

Según Arias (2006)¹⁵⁰ las variables independientes son aquellas que generan cambios en la variable dependiente. En concordancia con este sistema, la variable

independiente es el quitosano, biomaterial que generó cambios en la variable dependiente que es la regeneración ósea. En esta investigación también se tomaron en cuenta otros tipos de variables; una variable interviniente llamada Tiempo, representado en semanas de estudio ¹⁵⁰. A continuación se explica los parámetros por medio de los cuales se evaluó este sistema de variables:

Las **Variable independiente: El quitosano** en forma de *liposoma* cubierto con membrana al momento de su implantación. Representa una variable cualitativa, dicotómica y simple, cuyo nivel de medición es nominal, es decir, se midió según su ausencia o presencia en cada individuo, a lo largo del experimento.

La **Variable dependiente:** representada por la *regeneración ósea*. Se clasifica como una variable cualitativa, policotómica y compleja, descompuesta en tres (2) dimensiones: Hallazgos Radiográficos y Hallazgos Histológicos; con nivel de medición ordinal y nominal, de acuerdo a la dimensión que se evalúe.¹⁴⁹ Para la evaluación de esta variable, se determinaron diferentes indicadores para cada una de sus dimensiones. A saber:

- a. **Hallazgos radiográficos:** se tomaron radiografías a los animales de estudio en las semanas 3, 6 y 9 posterior a la cirugía experimental para valorar los siguientes parámetros radiográficos:

Evaluación radiográfica cualitativa

- **Radiopacidad** observada en el defecto:
0= Ausente
1= Presente
- **Continuidad radiográfica de la zona intervenida con el hueso circundante:**
0= No
1= Si.

- **Cantidad de la aposición mineral:** Siguiendo los criterios descritos en la tabla 5.

Tabla 5. Escala para medir radiográficamente la cantidad de aposición mineral

0	Escasa	Densidad en la cavidad ósea que cubre menos del 50 % del defecto.
1	Moderada	Densidad en la cavidad ósea que cubre entre el 50 y 80 % del defecto.
2	Abundante	Densidad en la cavidad ósea que cubre más del 80 % del defecto.

Estos dos últimos parámetros radiográficos se valoraron cualitativamente usando como comparación una escala de aluminio que establece 7 niveles de radiopacidad análogos a la imagen de la mineralización del hueso. Los 3 primeros escalones de la derecha corresponden a un grado de mineralización casi total o nivel 2 de aposición mineral; los 2 últimos peldaños de la derecha asemejan las primeras etapas de mineralización, nivel 0 o mineralización escasa; finalmente los recuadros de aluminio de la región central de la regla, representan el nivel 1 o mineralización moderada. (Figura 18)



Figura 18. Radiografía de una hemimandíbula de rata donde se muestra la escala de aluminio en su parte inferior.

Fuente: Peral y cols. (2008)¹⁵¹.

Evaluación radiográfica cuantitativa de la Regeneración Ósea: En este parámetro radiográfico se tomó en cuenta el área de extensión de los defectos óseos al inicio y final de cada semana de evaluación. Para ello se midió la longitud y el ancho del defecto óseo, se multiplicaron ambas mediciones para hallar el área expresada en milímetros cuadrados. (Figura 19)

Área del defecto (radiolucidez total) = longitud (L) x ancho (A)

$$\text{cm}^2 = \text{cm de L} \times \text{cm de A}$$



Figura 19. Medición del defecto óseo en radiografía de referencia. El lado experimental está identificado por la zona radiopaca en el área superior izquierda en la película radiográfica (trozo de papel de plomo y clip). **Fuente propia.**

Entonces la extensión de la regeneración alcanzada es el resultado de la diferencia entre ambas medidas [inicial-final].

Extensión de la regeneración o radiopacidad = área inicial – área final

Posteriormente esta medida se puede extrapolar a porcentaje de regeneración por efecto de una regla de tres: en su cálculo se considera que el porcentaje de regeneración ideal a alcanzar o 100% de regeneración ósea, es equivalente a medida inicial del defecto, constante que se multiplica por este 100% y se obtiene un porcentaje de extensión de Regeneración Ósea Guiada en los defectos óseos tratados y no tratados. Tomando de ejemplo las medidas de la radiografía anterior, el cálculo sería el siguiente (figura 20):

Medida inicial → 100% de regeneración ósea
 Extensión de la radiopacidad → $X = [\% \text{ de regeneración alcanzado}]$.

Donde

$$X = \frac{\text{extensión de la radiopacidad} * 100\%}{\text{área inicial del defecto K (1cm de longitud x 0,5 cm de ancho)}}$$

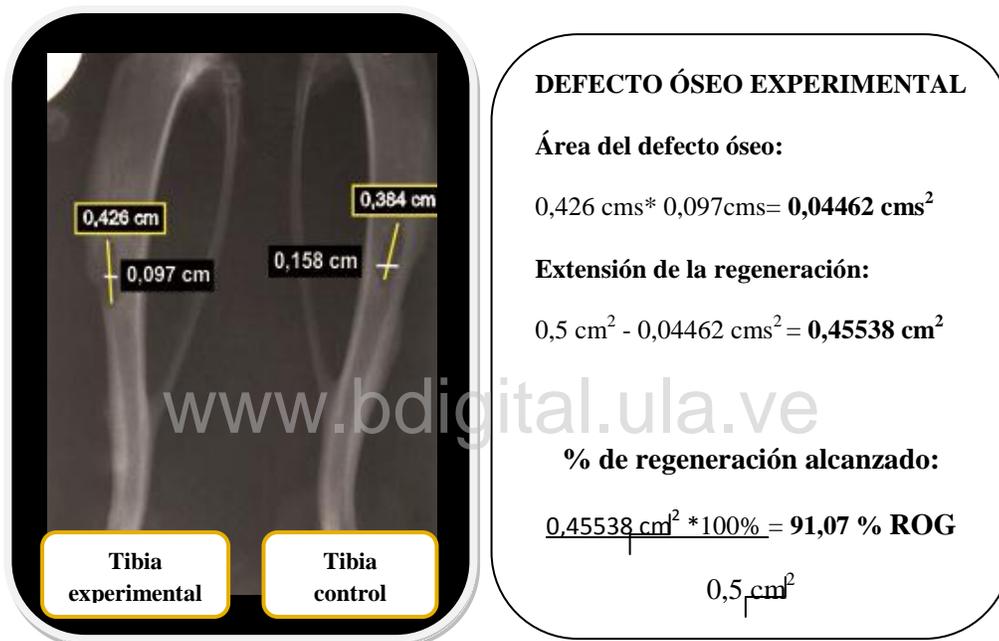


Figura 20. Obtención del porcentaje de ROG de los defectos óseos. Fuente: propia

Parámetros Histológicos: evaluados a través de los siguientes indicadores, según los criterios de la **Escala de Heiplie**¹⁵²:

Grado de madurez ósea

0. Ausente.

1. Presencia de células indiferenciadas.
2. Proliferación y diferenciación de las células indiferenciadas a células formadoras de hueso.
3. Presencia de islotes aislados de hueso inmaduro.
4. Espículas óseas uniendo los islotes de hueso inmaduro conformando un patrón heterogéneo.
5. Hueso maduro compacto.

Presencia y calidad de médula ósea

0. Ausente.
1. Hematopoyéticamente activa, presencia mayoritaria de eritrocitos.
2. Disminución del número de eritrocitos y aumenta el de adipocitos.
3. Médula ósea amarilla.

Continuidad del defecto-hueso normal (unión ósea)

0. Ausencia de formación ósea en el reborde del defecto.
1. Escasa formación ósea.
2. Moderada formación ósea; 2/3 del defecto sin relleno óseo.
3. Elevada formación ósea; 1/3 del defecto sin relleno óseo.
4. Relleno casi total del defecto (mayor de 2/3 del defecto).
5. Continuidad del defecto con el hueso normal del 100%.

Formación ósea periférica

0. Ausente.
1. Escasa.
2. Moderada.
3. Elevada.

Técnica de recolección de datos

La recolección de los datos se llevó cabo mediante la técnica de la observación indirecta ¹⁵⁰, ya que se valoraron de manera sistemática los cambios radiográficos e histológicos que se presentó en los ejemplares biológicos, observándolos a través de las radiografías y preparados histológicos. Asimismo se trató de una observación estructurada, puesto que se utilizaron instrumentos detallados y categóricos para la recopilación de los datos observados.¹⁴⁹

Instrumentos de recolección de datos.

La recolección de los datos, fue llevada a cabo mediante el uso de dos (2) fichas, contentivas de los parámetros antes mencionados. Éstas fueron valoradas por expertos en cada área, para los hallazgos radiográficos e histológicos. Cada una de las fichas, contienen las listas de cotejo y escalas de estimación, las cuales permitieron registrar estructuradamente la presencia o ausencia de los diferentes indicadores e igualmente el grado en que se manifestaron algunos de estos. (Anexos A, B)

La lista de comprobación o de cotejo, consiste en una lista de los aspectos relacionados con el evento de investigación. Durante las evaluaciones, ésta permite registrar sistemáticamente si la condición o situación aparece o no.¹⁵⁰

Además se utilizó como medio complementario el registro fotográfico del procedimiento quirúrgico, del control radiográfico y de los preparados histológicos. Para efectos de las mediciones las fotografías de las radiografías se procesaron en un editor de imagen Corel Draw versión X5 para su medida y amplificación sin distorsión ni aumento real del área.

Aspectos Bioéticos sobre la experimentación en animales.

La experimentación en animales, es hoy en día una actividad que se realiza comúnmente en las ciencias de la salud, para resolver enigmas médicos y

odontológicos existentes, ya que permite realizar una fase de evaluación preclínica para evaluar tratamientos ó procedimientos clínicos y la administración de sustancias químicas ó fármacos, que ofrecen una potencial utilidad terapéutica pero que no se ha probado su efecto ó toxicidad en seres humanos. Estos resultados permiten conocer la relación riesgo/beneficio, para posteriormente ser probados en humanos.

La presente investigación, se rigió por las consideraciones del código de Bioética y Bioseguridad actual, establecidas por el Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias - Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT-2008). Estas normas expresan que los animales de experimentación, deben ser tratados como organismos vivos sensibles, para evitar o minimizar cualquier incomodidad, sufrimiento o dolor. De igual modo, se les debe aplicar sedante, analgésico y/o anestesia, a los animales que serán tratados con procedimientos dolorosos (como cirugías) y los sacrificios debe realizarse de manera no dolorosa. Adicionalmente, este proyecto de investigación, fue discutido y aprobado por la Comisión de Bioética del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), identificado con el protocolo: CE BIOULA/003.

Entre algunos de los lineamientos seguidos en este estudio, para respetar el Código de Bioética, es vital el empleo de la cantidad mínima necesaria de animales, para obtener datos estadísticos válidos. Adicionalmente todos los participantes del experimento realizamos un adiestramiento, para la manipulación y experimentación de animales vivos, recibido en el Bioterio de la Universidad de Los Andes y dictado por especialistas en manejo de animales de laboratorio. Aunado a ello, se aplicó una prueba piloto con 3 ratas, con la finalidad de precisar las dosis de anestesia y estandarizar la técnica y los tiempos quirúrgicos, así como calibrarse con los ayudantes en cuanto a esto y la manipulación del biomaterial.

Se consideraron diversas medidas para garantizar el bienestar del animal durante la realización del experimento, no solo para minimizar el estrés o sufrimiento de estos, sino para asegurar que la reacción que se genera en el animal sea igual o

semejante a la que se presentará en los humanos, tomando en cuenta ciertas semejanzas en el comportamiento biológico de ambos. Es por ello que los animales fueron alojados en un ambiente apropiado, adaptados a las condiciones del laboratorio (luz, humedad, ventilación, ruidos y temperatura) sin hacinamiento y recibieron agua y comida (ratarina de protinal®) *ad libitum* y el encamado fue cambiado periódicamente por el personal técnico del BIOULA para mantener las condiciones de higiene de las jaulas. Además, se aplicó anestesia local aún cuando el animal tenía sedación profunda para evitar el sufrimiento innecesario del animal. Adicionalmente, cada procedimiento del experimento fue supervisado por la Dra. Rosa de Jesús Durán, Md. Veterinario Yepsis Quintero y Lic. Mileina Gudiño, especialistas en manejo de animales de laboratorio, del Bioterio de la Universidad de Los Andes.

Materiales, Instrumental y Equipos.

Estos insumos se presentan discriminados por lo que se requirió en cada procedimiento.

Materiales para la experiencia quirúrgica:

- ✓ Liposomas y membranas de quitosano, manufacturadas por la autora de este trabajo y la jefe del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela).
- ✓ Frascos de vidrio estériles como contenedores de los liposomas
- ✓ Agua destilada
- ✓ Campos odontológicos impermeables para las mesas de trabajo
- ✓ Papel absorbente
- ✓ Ketamina y Xilacina (anestésicos generales).
- ✓ Lidocaína al 2% (anestésico local).
- ✓ Meloxicam.

- ✓ Lincomicina
- ✓ Jeringas de insulina debidamente identificadas con el nombre de su contenido (medicamentos).
- ✓ Jabón iodado para limpiar el área antes de la depilación
- ✓ Iodo acónito para asepsia del área de intervención antes del corte
- ✓ Solución Ringer para el lavado del defecto.
- ✓ Gasas estériles.
- ✓ Agua oxigenada para limpiar la herida una vez suturada
- ✓ Sutura reabsorbible 4-0 para el plano muscular
- ✓ Sutura seda negra 3-0 para sutura del plano epitelial
- ✓ Gerdex ® para la desinfección del instrumental y equipos en la sesión quirúrgica y limpieza antes de la esterilización en autoclave.
- ✓ Tijera de mayo para cortes de las secciones de hueso posterior al sacrificio
- ✓ Envases de plástico de tapa rosca con formalina al 10% para conservar muestras de hueso

Insumos para el procesamiento radiográfico de las muestras:

- ✓ Películas radiográficas N° 2, velocidad E.
- ✓ Dispositivos XCP estériles con bloque de mordida posterior para mantener la misma distancia focal en cada exposición
- ✓ Revelador y fijador de películas radiográficas
- ✓ Clips y papel de plomo
- ✓ Sobres individuales identificados para cada radiografía
- ✓ Pinzas algodonerías estériles para la manipulación de las muestras
- ✓ Gasas odontológicas

Para el procesamiento histológico de las muestras:

- ✓ Formalina al 10%
- ✓ Hematoxilina y eosina
- ✓ Alcohol isopropílico al 99%
- ✓ Xilol
- ✓ Parafina líquida y para conformar bloques (paraplast®)
- ✓ Martex® como medio de montaje
- ✓ Osteomoll® (ácido clorhídrico más formaldehído)
- ✓ Casetas plásticas para la inmersión de las muestras en parafina
- ✓ Moldes tipo barras de Leuka
- ✓ Portaobjetos y cubreobjetos

Instrumental

Para la experiencia quirúrgica:

- ✓ Calibrador odontológico metálico
- ✓ Jeringa carpule con succión para la anestesia local
- ✓ Hojas de bisturí nº 15 y mango de bisturí nº 3 para el corte y disección del plano epitelial y muscular
- ✓ Pinzas mosquito.
- ✓ Pinza para tejidos
- ✓ Legra p23 para la visualización del hueso
- ✓ Micromotor portátil NSK
- ✓ Fresas quirúrgicas tallo largo cilíndricas número 701 para la creación del defecto de forma regular y simétrico
- ✓ Jeringas de 10cc para irrigación del área
- ✓ Espátula 7ª para el transporte de los liposomas.
- ✓ Compás: para marcar y medir el defecto antes y después del desgaste

- ✓ Regla milimetrada: medición del defecto.
- ✓ Pinza portaagujas
- ✓ Tijeras para cortar sutura
- ✓ Marcadores de colores y etiquetas para cada caja de los animales.

Equipos:

- ✓ Revelador automático de radiografías periapicales
- ✓ Equipo de rayos X intraoral Elitys® by Tropy. 60 Kv, 7 Ma, f0, 0,037s
- ✓ Escáner Epson para el registro digital de los hallazgos radiográficos
- ✓ Microscopio óptico de doble cabezal (Nikod®.)
- ✓ Microtomo TBS®.
- ✓ Estufa de calor seco (Gemmy Industrial Corp®).
- ✓ Esterilizador de rayos ultravioleta para los liposomas
- ✓ Autoclave
- ✓ Cámara fotográfica semi-profesional marca Panasonic modelo Lumix, de 12 megapíxeles
- ✓ Balanza electrónica

Procedimientos.

Los animales fueron intervenidos en grupos de 8 por semana y 9 en la última semana de cirugía, hasta intervenir a los 25 animales previstos. Llevándose a cabo dicha experiencia en un total de 3 semanas de procedimientos quirúrgicos que fueron llevados a cabo en tres (3) etapas (fase preoperatoria, operatoria y postoperatoria). El proceder quirúrgico particular de esta investigación para cada animal fue el siguiente:

Fase Prequirúrgica:

Luego de la organización de las mesas de trabajo con todos los insumos, instrumental y equipos necesarios, se asignaron de forma aleatoria los animales a cada grupo de evaluación 3, 6 y 9 semanas, identificándolos por marcas de color rodeando la base de la cola de los animales, de acuerdo al grupo de estudio. Se rotularon las cajas individuales para cada rata. En cada intervención se registró la fecha en la que se realizó tanto en el cuaderno de trabajo, ficha de recolección de datos como en la etiqueta de la caja.

Se comenzó por el pesaje del animal para el cálculo de las dosis anestésica, analgésica y antibiótica. Luego se administró el anestésico Tiopental (Pentotal®) en dosis de 0,5 ml/kg vía intraperitoneal y una vez sedado se preparó el campo operatorio lavando con solución Betanide® y depilando ambas patas del animal. (Figura 21) La frecuencia de la administración de tiopental para la anestesia quirúrgica dependió del tiempo de la intervención en relación al efecto ultracorto de la droga. Sin embargo, se procuró realizar la intervención en ambas patas en el menor tiempo posible bajo una única dosis anestésica.

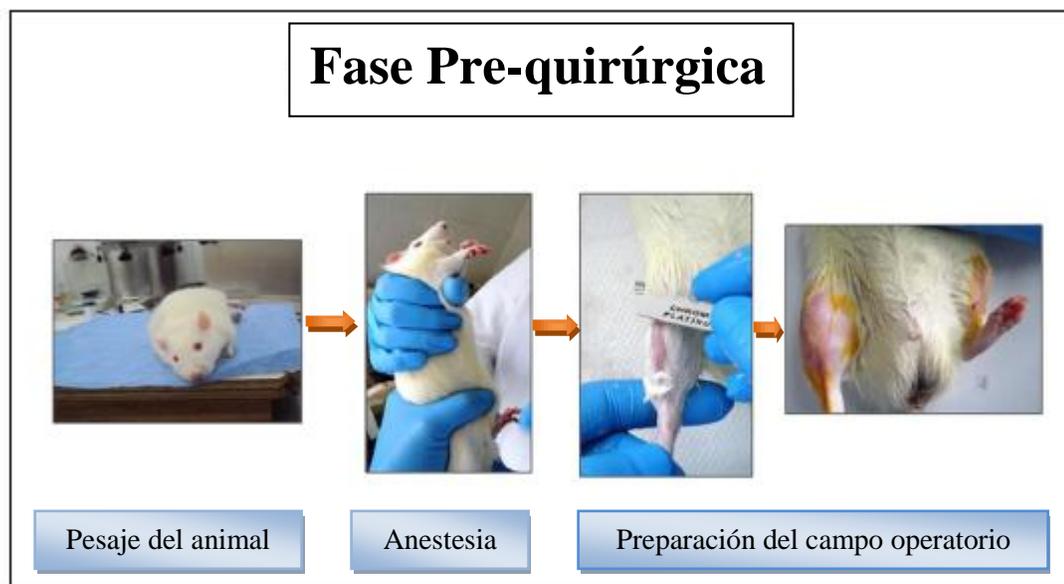


Figura 21. Pasos de preparación del animal para la experiencia quirúrgica.

Fase Quirúrgica:

Se inmovilizó cada pata trasera comenzando la experiencia por la pata derecha de la wistar o lado experimental. Se aplicó anestesia local intramuscular en el área en dosis de 0,25 ml de Lidocaína (Rapicaine®) al 2% con adrenalina al 1.100.000. Se diseñó el colgajo longitudinal y con una hoja de bisturí No 15, se realizó una incisión de 2 cm longitudinalmente sobre la cara anterior de cada pata, luego se separó la piel y el espacio intramuscular hasta visualizar el músculo cortándolo hasta liberar el hueso. Se cortó el periostio cuidadosamente y se separó de la tibia. Con un micromotor, una fresa cilíndrica 701, se realizó el fresado o desgaste del hueso a baja velocidad en posición totalmente vertical, en refrigeración constante con solución fisiológica y secado con gasa estéril, hasta obtener un defecto óseo lineal de 1cm de longitud y de ancho 0,5 cm, con profundidad de la mitad de la punta activa de la fresa hasta llegar a médula. Se lavó con solución fisiológica y secó con gasa estéril. (Figura 22)

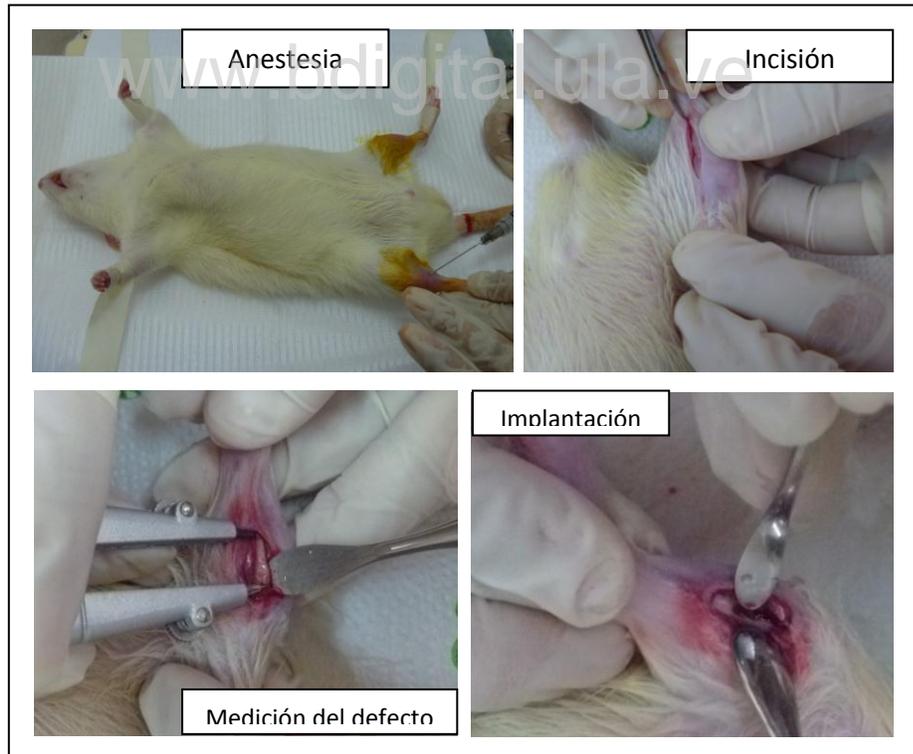


Figura22. Anestesia, incisión, abordaje, realización del defecto e implantación del liposoma de quitosano dentro del mismo.

Luego se implantó sobre la pata derecha de uno a dos liposomas de Quitosano, una vez inserto se cubrió con membrana de quitosano para estabilizar el relleno. Se reposicionaron los tejidos cuidando de no movilizar la membrana. El musculo se suturó con técnica continua usando sutura reabsorbible Vicryl® 4-0 y en la piel con sutura no reabsorbible seda negra 3-0 que se retiraba a los 8 días posteriores a la cirugía. (Figura 23)

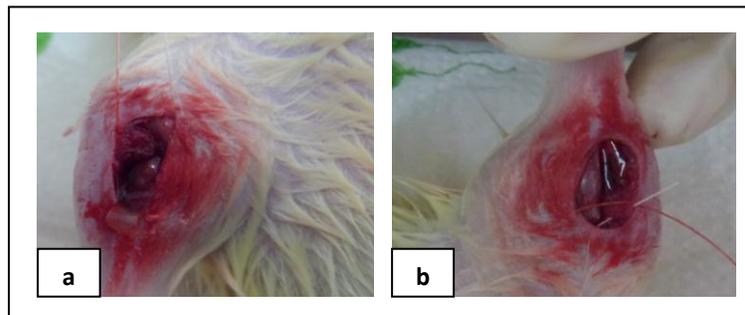


Figura23a. Presutura muscular para fijación de la membrana. **b.** Sutura de planos muscular y epitelial.

Se repitió el mismo procedimiento en la pata izquierda, salvo que no se implantó nada. Inmediatamente terminada la cirugía se le administró analgésico (Meloxicam, 1,0 mg/kg de peso 1 vez al día por 3 días, vía subcutánea) y antibiótico (Lincomicina 0,015 ml suministrado en dosis única, vía intraperitoneal) por vía intramuscular en dosis únicas. Los animales se ubicaron en jaulas individuales, observándolos hasta recuperar conciencia y se trasladaron a un cubículo acondicionado y sólo para este grupo de animales, fueron vigilados y alimentados por el personal técnico del BIOULA.

Fase Post-quirúrgica:

A la tercera, sexta y novena semana se sacrificaron los animales mediante la utilización de sobredosis anestésica intraperitoneal con tiopental. La obtención de las muestras para la valoración histológica y radiográfica se realizó mediante disección y cada una de las muestras fue identificada e inmersa en formalina al 10%. Se cortaron los bloques del área de la tibia intervenida usando micromotor y fresa de carburo en

rueda para cortar los bloques, obteniéndose un total de 70 muestras durante todo el experimento. (Figura 24).

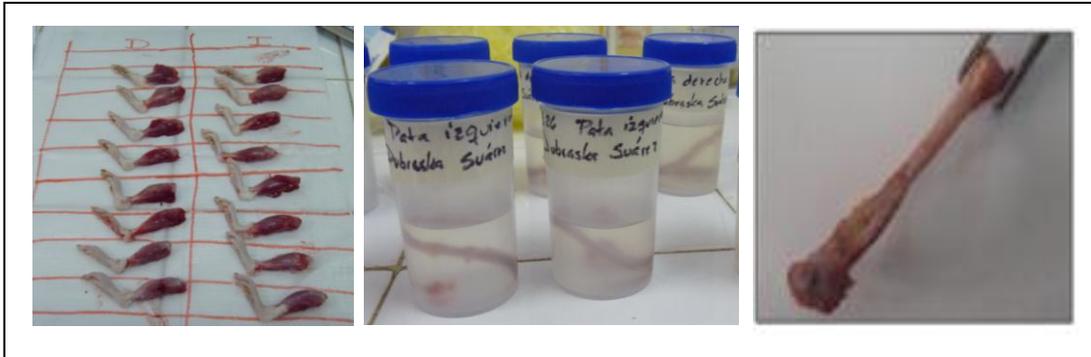


Figura24. Diseción y conservación de las tibias.

Se llevó a cabo la toma de radiografías colocando la película radiográfica n° 2 sobre un mesón alto, la ubicación del cono en forma vertical, a una distancia focal constante previamente estandarizada por medio del bloque de mordida posterior del juego XCP para radiografías periapicales. El tiempo de exposición fue de medio segundo y los parámetros de exposición fijados en un rango de 70 a 90 Kv y miliamperaje de 10 a 15 mA. Se colocaron ambos bloques de tibias (derecha e izquierda) en cada película radiográfica, ubicando el área de defecto hacia arriba. La identificación del lado experimental se logró colocando un clip en la esquina superior izquierda de la película radiográfica. Se revelaron automáticamente y se digitalizaron usando escáner para el llenado del instrumento

Posteriormente se realizó el estudio histológico en el cual las muestras fueron descalcificadas individualmente durante 1 semana en Osteomoll® (ácido clorhídrico más formaldehído), luego se marcó el área del defecto con hematoxilina, se colocaron en cassetes identificados y fueron introducidas en la batería de alcoholes (deshidratación alcohólica progresiva) en la cual se cumplieron los siguientes pasos:

- Inmersión en agua corriente hasta por 24 horas cambiando el agua con regularidad

- Tinción con hematoxilina marcando el área del defecto. Las muestras se introdujeron en casetas plásticas correctamente identificadas, procurando que la cara marcada quedase en contacto con la parte posterior de la caseta.
- El tejido fue procesado mediante la técnica de **deshidratación, aclaramiento e infiltración**. La deshidratación con alcoholes de gradación creciente, mediante inmersión de las muestras en alcohol isopropílico al 99% cinco veces por una hora en cada inmersión. Luego se pasaron por xilol alcohol por 1 hora.
- Seguidamente aclaramiento con xilol por 1 hora, que desplaza el alcohol para permitir la miscibilidad con la parafina fundida, buscando que al extraerse de la solución gotee todo el remanente de xilol antes de pasar al parafinado.
- Se llevaron a la estufa las muestras embebidas en parafina a 56°C por 2 horas. Al culminar este parafinado se incluyeron en bloques de parafina (paraplast®) conformándolos con moldes barras de Leuka. (Figura 25)

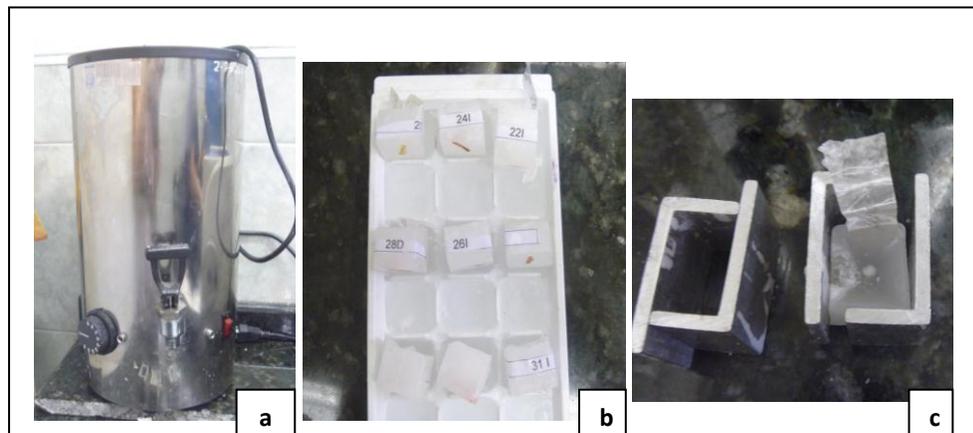


Figura 25a. Máquina de baño de parafinado. **b.** Bloques de muestras parafinadas.
c. Conformadores de bloques de parafina barras de leuka.

- Cada bloque de parafina se seccionó con el micrótopo obteniéndose de 3 a 6 cortes de 0,5 micras (Figura 26 a). Los cortes resultantes se montaron en portaobjetos y se introdujeron en la estufa 2 horas para desparafinarlas. (Figura 26 b).

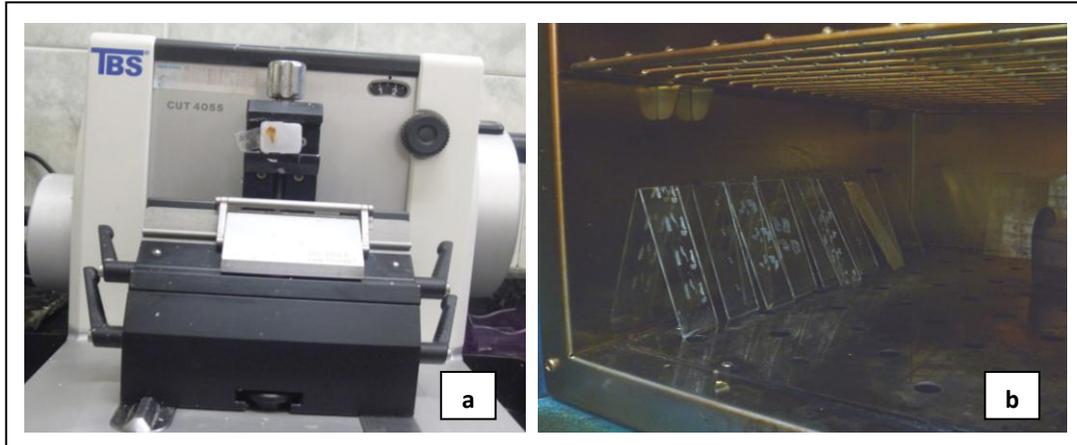


Figura 26. aCorte de la parafina para el montaje. b. Láminas en la estufa de calor seco.

- Se realizó la coloración y montaje de los preparados histológicos (Figura 27). La batería de coloración aplicada se explica en el diagrama a continuación:

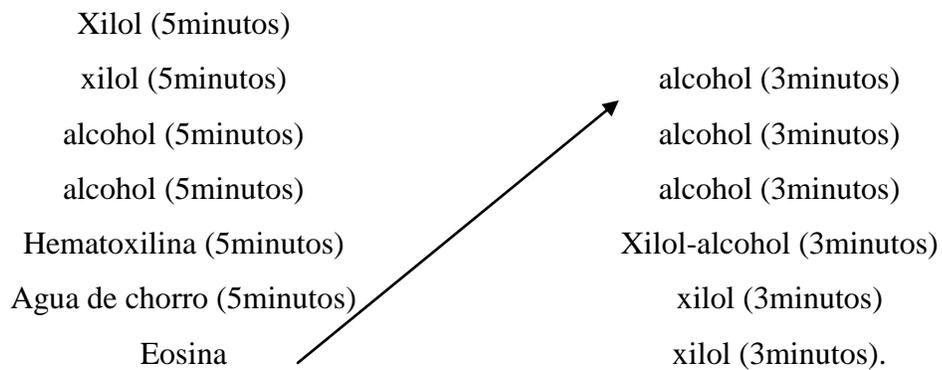




Figura 27. Batería de coloración de las muestras

- Se usó como medio de montaje el Martex[®] y se colocaron los cubreobjetos sobre todos los preparados histológicos.(Figura 28)

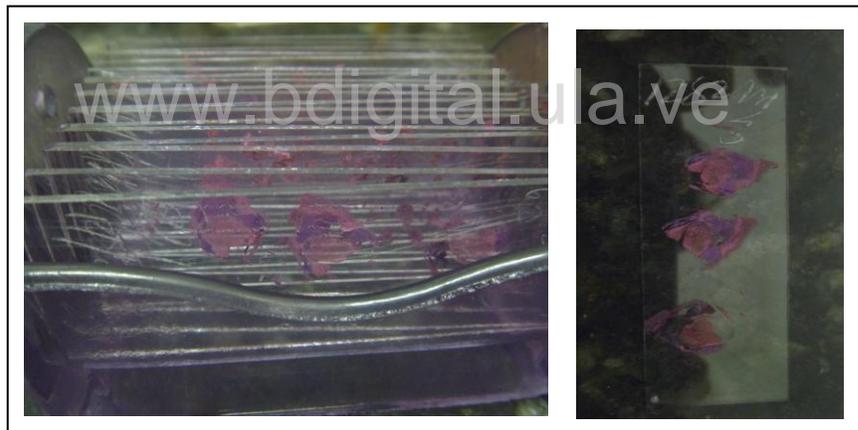


Figura 28. Preparados histológicos.

- Se inspeccionaron las láminas de los preparados obtenidos. Este procedimiento se llevó a cabo usando un microscopio óptico de doble cabeza para permitir la observación del autor y el experto simultáneamente. Un primer vistazo para la familiarización y calibración de los observadores y una segunda ronda de observaciones para el llenado del instrumento.

Metodología estadística

Los datos fueron procesados en el programa informático estadístico SPSS versión 15.0 para Windows. Cada parámetro fue analizado según estadísticos descriptivos básicos, utilizando distribución de frecuencias para las variables categóricas, y estadísticos descriptivos de resumen de datos como medidas de tendencia central (media aritmética) y de dispersión (mínimo, máximo y desviación estándar) para las variables relacionadas con las medidas del defecto óseo y cantidad de hueso neoformado. Adicionalmente previa comprobación del supuesto de normalidad e igualdad de varianzas, se analizaron las medidas radiográficas cuantitativas a través de la prueba T para muestras relacionadas, con un nivel de confianza del 95%, a fin de conocer si existieron diferencias significativas entre las medias de ambos grupos en cada una de las evaluaciones.

Para la prueba de significancia estadística, se tomaron en cuenta dos tipos de hipótesis:

H_0 : El porcentaje promedio de regeneración ósea en el grupo experimental es igual al porcentaje promedio de regeneración ósea en el grupo control.

H_A : El porcentaje promedio de regeneración ósea en el grupo experimental es diferente al porcentaje promedio de regeneración ósea en el grupo control.

El criterio de decisión fue:

Si p_{valor} es menor o igual al nivel de significación $\alpha = 0,05$ (5% de error), se rechaza la hipótesis nula. En caso contrario ($p_{\text{valor}} \geq \alpha = 0,05$) no se rechaza la hipótesis nula.

Por otro lado, se aplicó el test no paramétrico de signos de Wilcoxon para muestras relacionadas para verificar si existieron diferencias en las medias de ambos grupos por semanas. Se hizo elección de la prueba de signos de Wilcoxon puesto que el test de Kolmogórov-Smirnov no reveló distribución normal de los datos por semana.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En el siguiente capítulo, se presentan los hallazgos obtenidos y su discusión. La muestra estuvo conformada por 25 ratas machos del linaje Wistar, divididas al azar en tres grupos de acuerdo a la semana de sacrificio o momento de evaluación: las que vivieron 3 semanas luego del experimento, el grupo cuyo sacrificio se llevó a cabo a las 6 semanas y el de las 9 semanas postquirúrgicas. En dichas muestras se evaluó la neoformación ósea en tibias, radiográfica e histológicamente, tanto del lado experimental con implantación de quitosano, como en las tibias control.

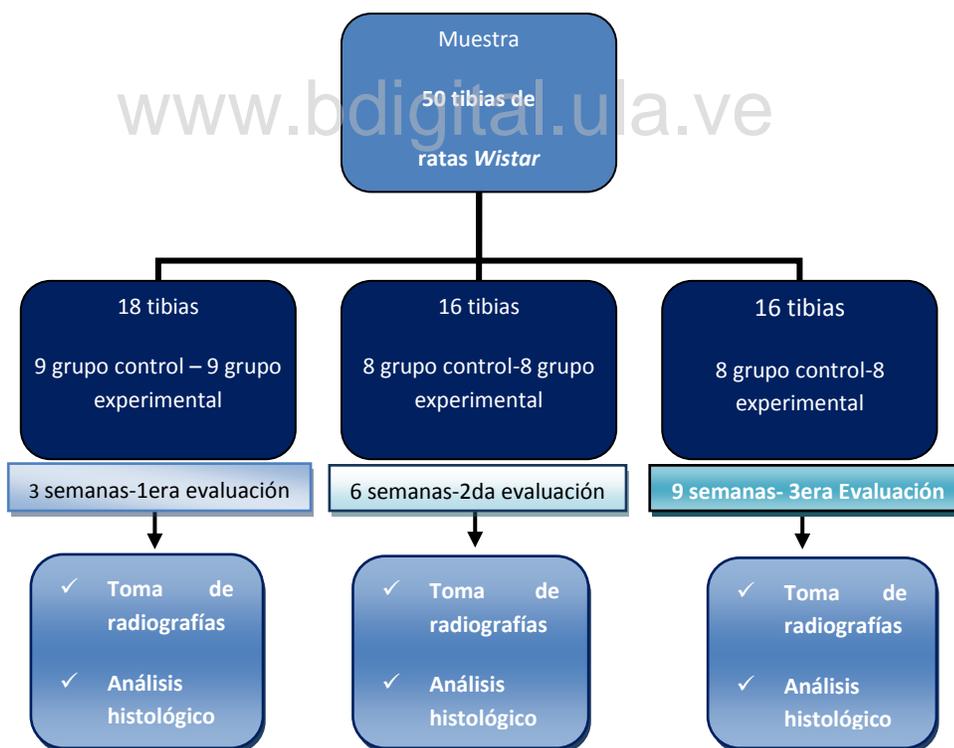


Figura 29. Distribución de los especímenes y sus tiempos de sacrificio.

HALLAZGOS RADIOGRÁFICOS CUALITATIVOS

Se realizó una prueba piloto en la cual se constató que radiográficamente el quitosano no se comporta como un artefacto radiopaco, en este sentido, las imágenes radiográficas diagnosticadas son indicativas de tejido óseo maduro o focos de mineralización.

- ***Radiopacidad del área intervenida:***

El primer parámetro valorado fue la *radiopacidad del área intervenida*, entendida ésta como la imagen radiográfica más densa o clara, debido a la gran densidad que posee el tejido que debería formarse dentro del defecto óseo. En cuanto a este parámetro para la **primera evaluación (semana 3)**, en el grupo experimental se observó presencia de áreas radiopacas dentro del defecto óseo en el 71,4 % de dicho grupo; en contraste con el grupo control cuyo nivel de radiopacidad fue nulo. A la **segunda evaluación (semana 6)**, la radiopacidad se situó en un 62,5% en el grupo experimental, seguida de un 25% de radiopacidad para el grupo control. Para la **tercera evaluación (semana 9)**, las zonas radiopacas se observaron en el 90% de las tibias experimentales, mientras que sólo se pudo verificar este hallazgo en el 30% de las tibias del grupo control. (Gráfico 1a)

El descenso en la radiopacidad observado en el grupo experimental a la semana 6, que posteriormente en la semana 9 asciende al 90% , pudo deberse a que para este modelo animal en esas condiciones, a las 6 semanas ocurre la remodelación ósea, y en consecuencia pasa por una fase de reabsorción disminuyendo el contenido mineral. También, especulativamente se puede presumir que existió una respuesta tan elevada y reactiva del tejido óseo, que en para evitar la sobresaturación del sistema se activó la acción osteoclástica en el área afectada.

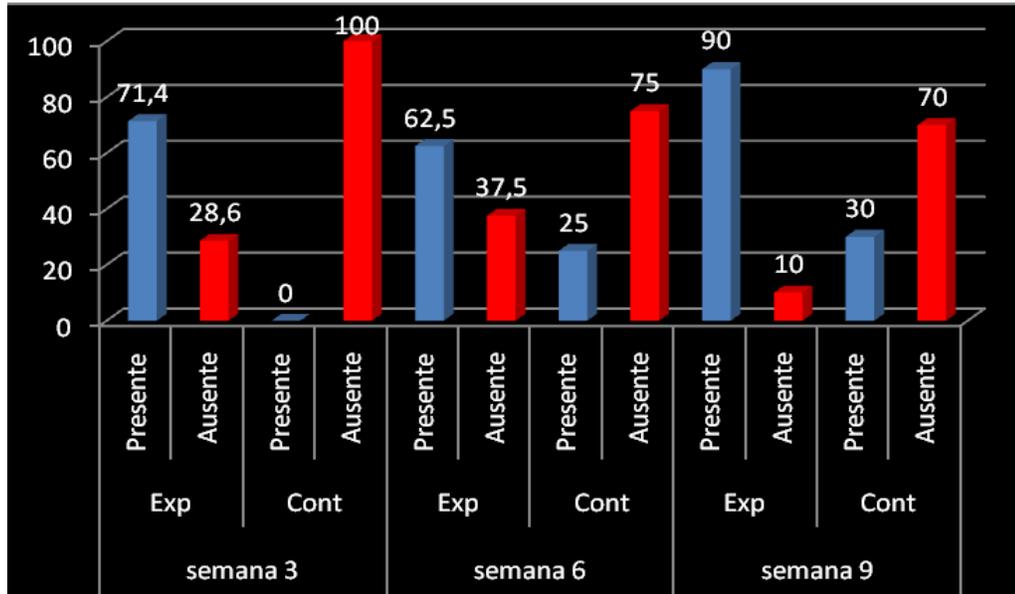


Gráfico 1a. Radiopacidad del área intervenida en cada evaluación

Complementariamente, se analizó de forma acumulada el comportamiento de este ítem al final del estudio para ambos grupos. En este sentido, la presencia de radiopacidad fue mayor en el grupo experimental (76%) que en el grupo control (20%).(Gráfico 1b)

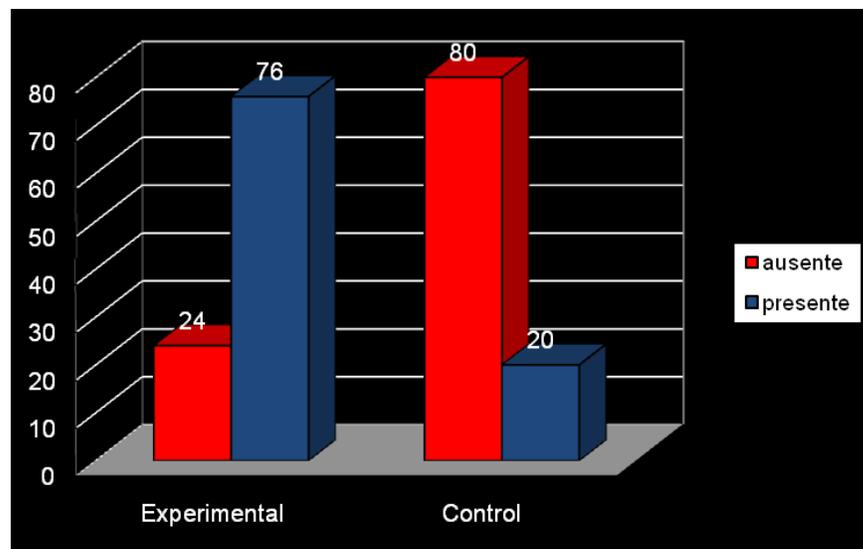


Gráfico 1b. Frecuencia acumulada de la radiopacidad del área intervenida.

- **Cantidad y extensión de la aposición mineral:**

El segundo parámetro valorado fue la radiopacidad pero en función de la *cantidad y extensión de la aposición mineral*. La apreciación radiográfica de los niveles de aposición mineral establecidos en la tabla 6 del anterior capítulo, se encuentran reflejados en la figura 30 como escasa (30a), moderada (30b) y abundante (30c). Lo deseable era alcanzar el mayor nivel de neoformación ósea o nivel abundante de mineralización.

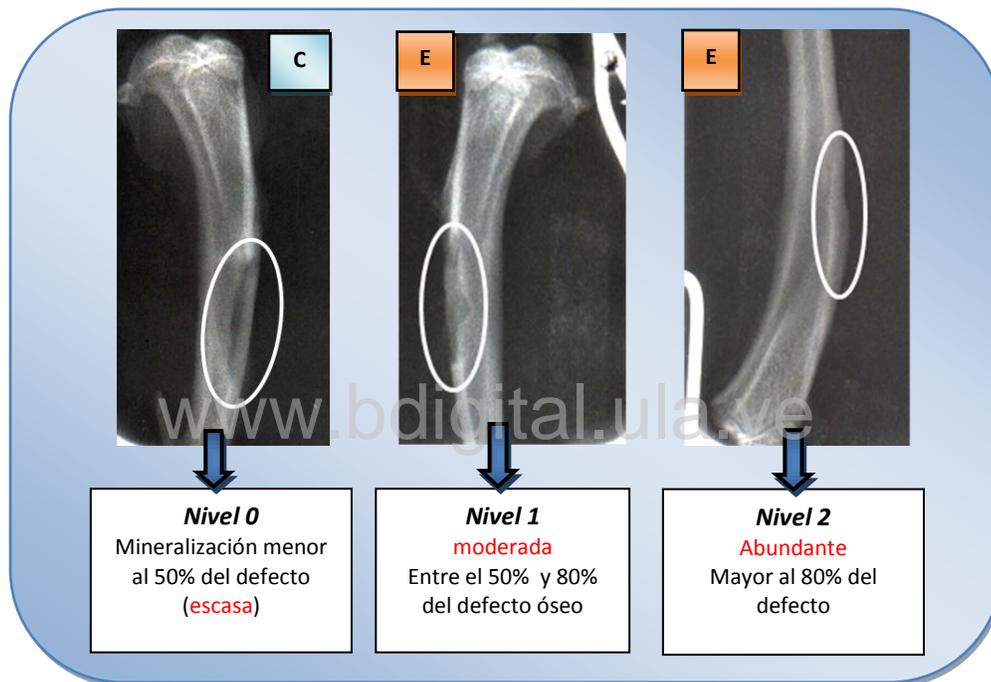


Figura 30. Imágenes típicas de cada nivel de mineralización del defecto. En cada radiografía periapical la tibia experimental se identifica a través del recuadro naranja con la letra E y el control con el recuadro azul con la C.

Al respecto, para la **primera evaluación** (semana 3) se observó mayor neoformación ósea moderada en el grupo experimental (85,71%), mientras que en el grupo control la mineralización escasa predominó en el 85,71%.

En la **segunda evaluación** (semana 6), en el grupo experimental predominó la mineralización moderada (62,5%), y en segundo lugar el nivel de mineralización

abundante (25%). En cambio, el nivel moderado (37,5%) predominó en el grupo control.

Para la **tercera evaluación** (semana 9), se observó neoformación ósea abundante en el 60% de los casos del grupo experimental, que fue mayor a la observada en el grupo control (10%).(Gráfico 2a)

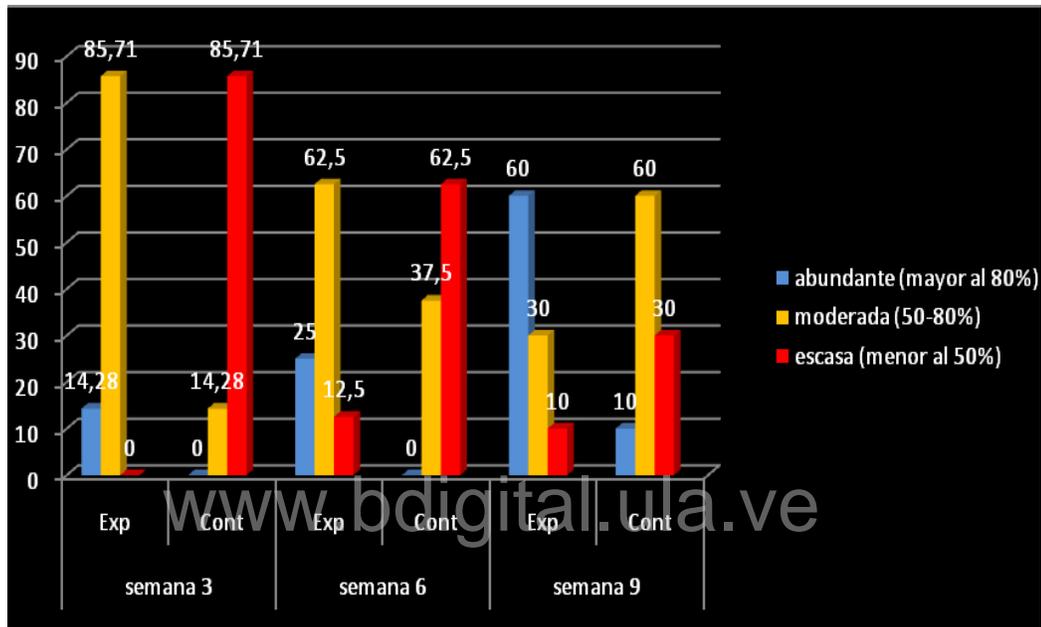


Gráfico 2a. Cantidad y extensión de la aposición mineral en ambos grupos, para la semana 3, 6 y 9 postquirúrgica.

En congruencia con los datos del gráfico anterior, los datos del gráfico 2b acerca del promedio de aposición mineral, denotan que dicho promedio fue mayor para el grupo experimental, con predominio de la categoría moderada (56%) y un promedio acumulado del 36% de neoformación abundante, contrastando con el grupo control, la categoría escasa fue frecuente en el 56% de tibias controles; seguido de un 40% de tibias con estatus moderado. (Gráfico 2b)

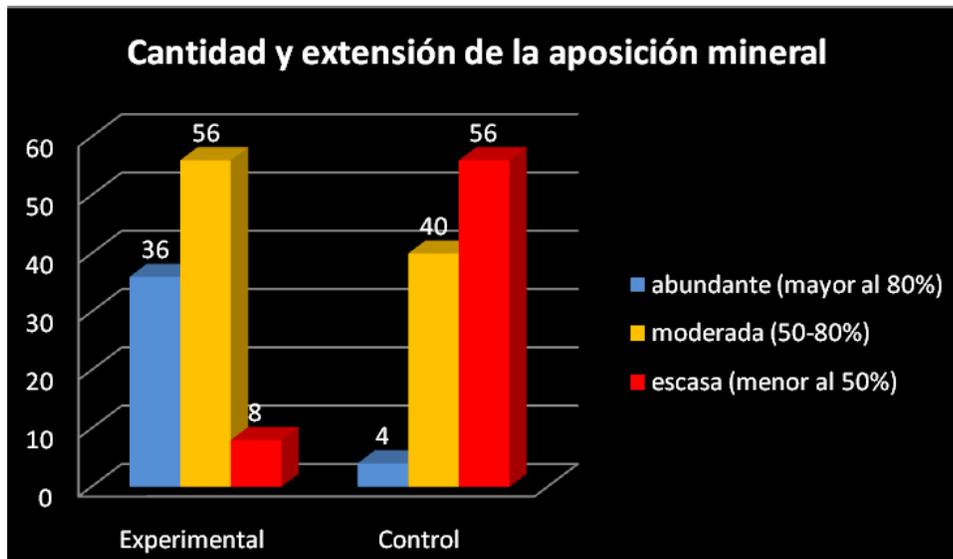


Gráfico 2b. Cantidad y extensión promedio de la aposición mineral al final del estudio.

De los resultados anteriores se desprende que la tendencia observada en las tibias tratadas con quitosano, en donde hubo un predominio de la radiopacidad cercana al 80% de reparación del total del defecto óseo, puede estar asociado a la posibilidad del biomaterial para actuar como osteoconductor, al brindar soporte, contacto y adhesión de las células osteoprogenitoras, similar al comportamiento de adhesión celular observado por Abarategui¹⁰¹ en estudios de cultivos celulares.

Por otra parte, el quitosano estaría actuando como osteoinductor al estimular la diferenciación celular en el sitio donde se encuentra implantado, comportándose como andamio bioactivo debido a su estructura química (polímeros de glucosamina), y al carácter policatiónico, que le confiere una alta afinidad para asociarse a las uniones celulares y a macromoléculas^{74, 75}, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica, lo que incide en la regeneración del tejido.

Una conducta radiográfica similar fue observada por Boynuegri y cols. (2009)¹⁵³, quienes trataron defectos óseos periodontales con gel de quitosano y el mismo gel combinado con membranas de colágeno. Estos autores hallaron radiográficamente un relleno óseo significativo en el grupo tratado con el gel de quitosano; vale destacar que los autores emplearon una presentación física similar a la utilizada en la presente investigación.

También coincidieron estos datos con el estudio de Campo y cols., (2011)⁵, quienes observaron imágenes radiopacas correspondientes a relleno óseo parcial en defectos óseos en tibias de ratas tratadas con membrana de quitosano, tanto a las 2 como a las 4 semanas de implantación. Así mismo Araujo y cols., (2012)³⁹ hallaron resultados similares en ratas *Wistar*, en los alvéolos postexodoncia tratados con liposoma de quitosano.

La similitud de los resultados descritos anteriormente, pueden atribuirse a la capacidad que posee el biomaterial de hincharse al estar en contacto con cualquier fluido corporal, sirviendo como matriz o andamio sobre el cual se precipitan minerales necesarios para la consolidación del defecto óseo, independientemente de la presentación física del material usado (liposoma o membrana), favoreciendo la neoformación ósea, resultados que se sustentan en algunos indicios presentes en este estudio y en los de Shin y cols., (2005) ⁽³⁴⁾, Yufeng y cols., 2007¹⁵, Espinoza (2007) ¹²⁶, Suphasiroj y cols. (2008) ³⁶ y Akman y cols. (2010) ¹⁴

- **Continuidad del defecto con el área circundante.**

Seguidamente fue valorada si dicha aposición ósea mantuvo continuidad con las paredes en la periferia del defecto, a este parámetro se le llamó *continuidad del defecto con el área circundante*. En la **primera evaluación (semana 3)**, para el grupo experimental la continuidad se hizo presente en el 71,42%, en comparación con un 28,57% de continuidad en las tibias controles.

Así mismo para la **segunda evaluación (semana 6)**, la frecuencia de esta categoría en el grupo experimental fue del 87,5%, seguido por el grupo control con un 25% de continuidad de la aposición mineral con las paredes del defecto óseo. Para la **tercera evaluación (semana 9)**, el 100% de las tibias experimentales presentaban continuidad y apenas un 40% de las controles exhibía este signo. (Gráfico 3 a)

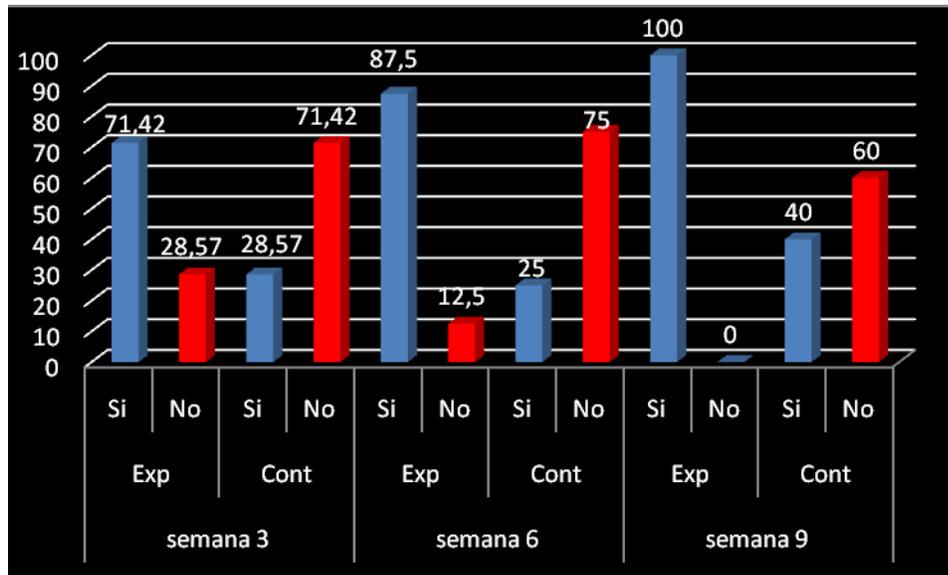


Gráfico 3 a. Continuidad del defecto con el área circundante en cada evaluación.

Al observar el acumulado promedio de continuidad para ambos grupos (Gráfico 3 b), se aprecia que este parámetro predominó en el grupo experimental, pues en el 88% de las tibias experimentales la neoformación logró consolidación con la periferia del defecto, mientras que solo se observó continuidad en el 32% del grupo control.

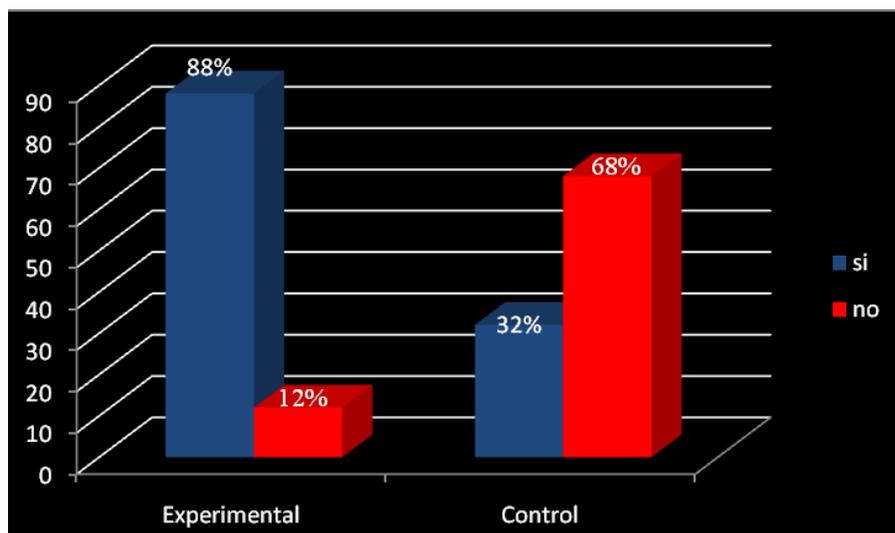


Gráfico 3 b. Promedio continuidad del defecto con el área circundante.

La continuidad del relleno óseo del defecto con el hueso circundante observada hasta en el 100% de los casos en el grupo experimental a la novena semana o tercera evaluación, podría sugerir que el biomaterial logró consolidación ósea a partir de la pared ósea que circundaba al defecto, pues este perímetro podría considerarse el sitio de osteogénesis en los casos en los que un biomaterial logra unión física y biológica con el tejido adyacente. Es lógico observar entonces una imagen radiopaca continua con el área donde se encontraban los límites o paredes del defecto, pues si el liposoma estaba hinchado ocupando este espacio la mineralización ocurriría con facilidad sobre esa matriz y a través de ella a manera de puente; mientras que el grupo control o no tratado está desfavorecido en este sentido, puesto que biológicamente para la regeneración ósea primero tiene que ocurrir la formación de una matriz colágena que posteriormente se mineraliza. Además, la ausencia de brechas entre el quitosano y el tejido óseo que rodea el defecto pone de manifiesto las mencionadas propiedades de biocompatibilidad, bioadhesión y oseointegración del biomaterial, que ya habían sido acuñadas por Shin y cols. 2005⁽³⁴⁾, Park y cols. 2008⁽³⁷⁾ y Miranda y cols. 2011³⁸.

La continuidad también es explicada por el estímulo que el quitosano ejerce en la actividad fibroblástica de la zona donde está implantado. Es decir, la interacción que se da entre el quitosano y los GAG o PG, por su similitud de su composición química (entre glucosaminoglicanos exógenos provenientes de la estructura del quitosano y proteoglicanos del organismo) para inducir que ciertas células como los fibroblastos que produzcan los elementos fundamentales como el colágeno. Esta estimulación también es posible gracias a la diferencia entre la carga del quitosano carga positiva a pH ácido, por lo que puede interaccionar con la superficie celular y proteínas plasmáticas.

En consecuencia si el biomaterial acelera la formación de una malla de colágeno, que en condiciones habituales el organismo tardaría mucho más tiempo en sintetizar, la continuidad del biomaterial con la matriz orgánica formada por esa red colágena y el hueso circundante, son eventos que podría sugerirse como parte de la explicación de la elevada frecuencia de continuidad observada en el grupo

experimental. Sin embargo este parámetro también tiene su análogo histológico mediante el cual se puede constatar con certeza si la continuidad radiográfica es real o solo un efecto óptico distorsionado por la bidimensionalidad de la radiografía.

HALLAZGOS RADIOGRÁFICOS CUANTITATIVOS

- **Reducción del área del defecto óseo:**

Para estimar este parámetro al culminar cada cirugía se midió el área de cada defecto (longitud x ancho) y luego se realizaron las mismas mediciones en cada semana de evaluación. Se consideró como **reducción del defecto**, la diferencia entre ambas medidas [inicial-final] para cada semana de evaluación. Este resultado no solamente indicó cuanto medía cada defecto en cada evaluación, sino que fue una medida indirecta de la extensión que la mineralización alcanzó en cada medición.

www.bdigital.ula.ve

El grupo experimental mostró mayor promedio de reducción que el grupo control en todas las semanas de evaluación como se puede apreciar en el gráfico 4. De forma detallada para el grupo experimental la reducción promedio para cada evaluación fue la siguiente: para la **semana 3 (primera evaluación)**, el promedio de reducción de los defectos en el grupo experimental fue de 37,2 mm². **Para la semana 6 (segunda evaluación)** resultó en 40,87 mm². Para la **tercera evaluación (semana 9)** el promedio de reducción aumentó a 44 mm². (Gráfico 4)

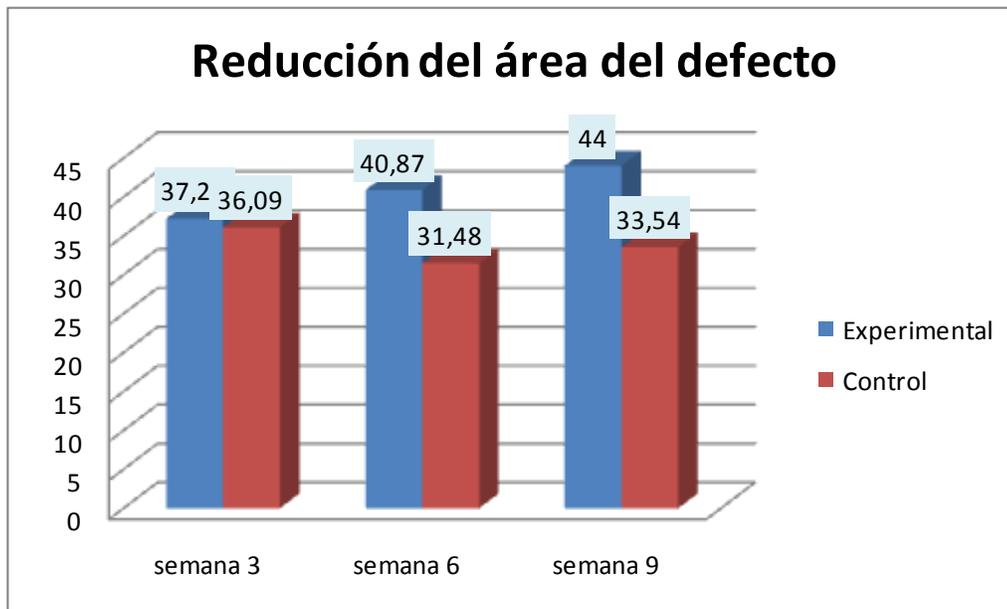


Gráfico 4. Promedio de Reducción de los defectos en cada evaluación para ambos grupos de estudio

www.bdigital.ula.ve

- **Porcentaje de regeneración ósea**

Adicionalmente, partiendo de las medidas anteriores para cada tibia (reducción del defecto o medida de la extensión de la mineralización), se obtuvo una medida porcentual de la neoformación ósea o porcentaje de regeneración ósea por la fórmula explicada en el anterior capítulo de marco metodológico. Partiendo de dicha fórmula se obtuvo el *Promedio de extensión de la regeneración ósea final en función del área inicial*.

En cuanto a esto, se pudo apreciar una marcada tendencia cada vez más ascendente **en el grupo experimental**, comenzando en la **semana 3** con el 74,43% de regeneración ósea, tendencia que finaliza con el 88% de regeneración ósea para la **semana 9**. Esta relación es divergente y opuesta con lo que ocurrió en el **grupo control**, en el que para la **semana 3** la frecuencia era muy similar a la del grupo experimental (72.18%) pero luego descendió a la **semana 6**. Al cabo de la **semana 9**

en el grupo control se encauzó la tendencia de la regeneración ósea (67,08%) pero dista mucho de la frecuencia observada en el grupo experimental (88%). (Gráfico 5)

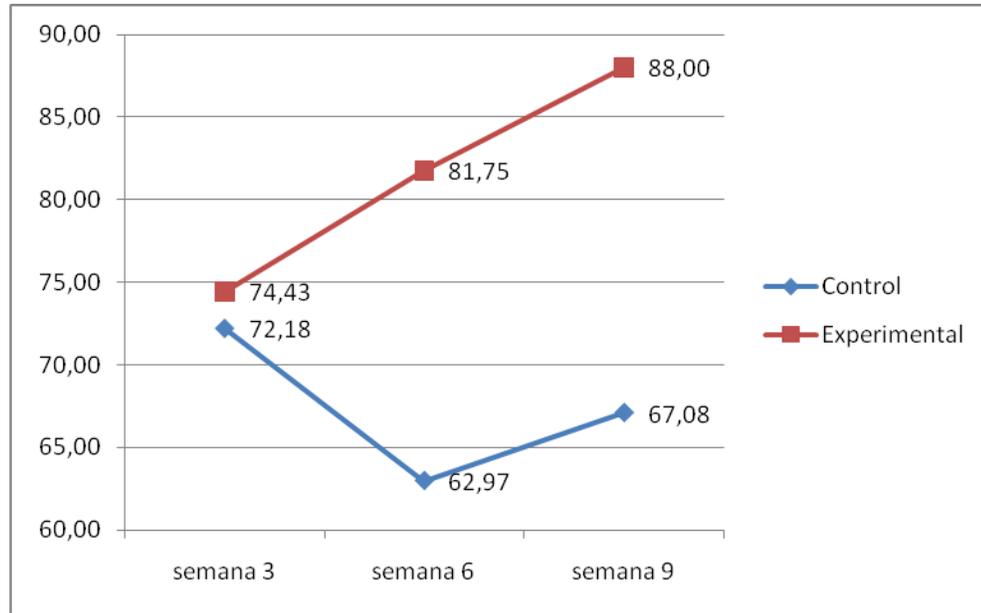


Gráfico 5. Extensión de la regeneración ósea

Aunque no se evidenció total regeneración ósea en el lapso de estudio, observando la tendencia del gráfico anterior se puede asumir que probablemente al cabo de 12 semanas este cometido se hubiese logrado. No obstante, ciñéndose a lo observado el lapso no fue suficiente para que se llevara a cabalidad la regeneración ósea en el sentido estricto del término.

- **Extensión de la regeneración ósea final en función del área inicial por grupos para todas las evaluaciones (acumulado).**

En cuanto al promedio de extensión de la regeneración ósea, en el grupo experimental (82%) fue mayor que en el grupo control (67%), confirmando lo observado en todos los hallazgos radiográficos e histológicos comentados.(Tabla 6)

Tabla6. Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	control	67,1936	25	19,21019497	3,842038993
	experimental	82,2008	25	10,9690101	2,193802021

Así mismo, se determinó la diferencia entre los promedios de regeneración ósea en el grupo control y en el grupo experimental. Esto se estimó a través de la prueba T que arrojó un p_valor 0,001, indicativo de que existen diferencias significativas entre las medias de regeneración ósea entre el grupo control y experimental (Tabla 7). Por tanto se rechaza la hipótesis nula que señalaba igualdad de las medias de ambos grupos, y se acepta la hipótesis alternativa, que establecía que existen diferencias significativas entre grupo experimental y control, diferencias observadas en el análisis descriptivo de las variables y que indicaban mayor porcentaje de regeneración ósea en el grupo experimental.

Tabla 7. Prueba T. Diferencia acumulada de medias muestras relacionadas entre grupos al final del estudio.

Diferencias relacionadas					T	gl	Sig. (bilateral)	
control - experimental	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia		Media	Desv. típ.	Error típ. de la media
				Inferior	Superior			
	-15,007	19,98435	3,996 870	-23,25633	-6,75806	-3,754	24	0,001

Por otro lado, para analizar cuantitativamente el comportamiento semanal del porcentaje de ROG en ambos grupos, se verificó el supuesto de normalidad en la

distribución de los datos usando el test de Kolmogórov-Smirnov, y se encontró que por semanas la distribución de los datos no es normal; por consiguiente, para verificar si existieron diferencias en las medias de ambos grupos por semanas se aplicó el test no paramétrico de signos de Wilcoxon para muestras relacionadas como alternativa a la prueba T (Tabla 8)

Tabla 8. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (prueba no paramétrica de diferencia de medias)

Evaluación	Experimental – Control	
semana 3	Z	-0,338061702
	Sig. asintót. (bilateral)	0,735
semana 6	Z	-1,960392118
	Sig. asintót. (bilateral)	0,050
semana 9	Z	-2,293412361
	Sig. asintót. (bilateral)	0,022

www.bdigital.ula.ve
Estadísticos de contraste(b)

- a Basado en los rangos negativos.
- b Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Para probar o no la hipótesis nula se estableció que:

$H_0 = \mu_C = \mu_E$ = no hay diferencias en las medias. El nivel de significancia se estableció en 0,05. Entonces para concluir que el grupo experimental obtuvo mayor regeneración ósea en menor tiempo que el control se estableció la hipótesis alternativa, $H_1 = \mu_C \neq \mu_E = <0,05$, la cual se acepta si las diferencias en las medias es menor a p 0,05.

En este sentido al observar el p_valor en la **semana 3** correspondiente a **0,735**, por ser mayor que 0,05 se acepta la H_0 , concluyendo que en este período de evaluación no existen diferencias significativas entre las medias de ROG del grupo experimental y control.

En la **semana 6**, el p_valor se ubica en **0,050**, y como representa el punto de corte la prueba no es concluyente en cuanto a si existen o no diferencias entre ambos grupos. Aunque en estas dos primeras evaluaciones no quedó definido el comportamiento de las medias, para la **semana 9** si se observaron diferencias significativas entre grupo experimental y control, pues p_valor fue **0,022**, que obliga a aceptar la hipótesis alternativa, indicando que sí se obtuvo mayor porcentaje de regeneración ósea en el grupo experimental, a la novena semana posterior a la implantación del liposoma de quitosano.

Estos resultados pueden explicarse por la rapidez con que se diferencian un mayor número de células en la estirpe osteoblástica y su crecimiento más acelerado en presencia de quitosano, rico en glucosaminoglicano, extrapolable a la inducción que producen los glucosaminoglicanos nativos que se encuentra intracelularmente en mastocitos del tejido conectivo y otras células hematopoyéticas, participando en la respuesta inmune e inflamatoria. También el quitosano pudo haber tenido actuación a nivel de la matriz extracelular como sucede con los proteoglicanos (PG) propios del cuerpo, los cuales participan principalmente en procesos de difusión de moléculas hidrosolubles, migración, proliferación y adhesión celular⁹⁷. Estos PG participan en interacciones célula-matriz extracelular, adhesión célula-célula y señalización celular.

La bioestimulación celular asociada al quitosano y su grupo funcional es un evento que ya había sido indicado por Suphasirroj y cols. (2008)³⁶ y Akman y cols. en el año 2010¹⁴ cuando lograron medir este efecto en cultivos celulares. En torno a la explicación de esta respuesta, autores como Venkatesan y Kim 2010¹⁵⁴, afirman que el quitosano por sí mismo no es osteoconductor pero al interactuar con la hidroxiapatita (presente en el medio óseo formando parte de la fase inorgánica del hueso y que es sintetizada para la reparación del defecto), mejora tal propiedad y por lo tanto el biomaterial es capaz de comportarse similar al hueso natural.

También los presentes datos referidos al porcentaje de ROG, son semejantes al comportamiento radiográfico de neoformación ósea observado en las heridas alveolares tratadas con liposomas de quitosano, en el mencionado estudio de Araujo y col. 2012³⁹. Tales autores encontraron entre un 57% y 62% de ROG a los 7 y 14 días

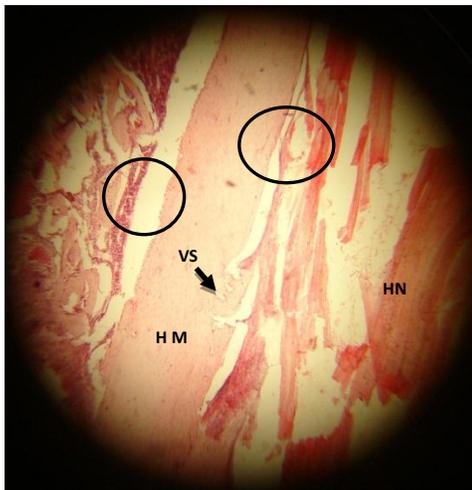
posteriores a la implantación del liposoma, porcentaje que además siempre fue mayor a lo observado en el grupo control.

No obstante los presentes porcentajes de ROG difieren de los obtenidos por Campos y col. 2011⁵, pues el máximo porcentaje obtenido por dichos autores fue de 25% a las 2 semanas y 36% a las 4 semanas. Es oportuno mencionar que estos investigadores usaron otra presentación física, la membrana de quitosano, y en consecuencia ésta presentación pudo funcionar principalmente como sistema de barrera y en menor medida como andamio. Situación opuesta a la que fue lograda con mayor contundencia en el presente estudio, pues el liposoma al hincharse dentro del defecto, ocupa mayor área y por tanto existe una mayor cantidad de biomaterial en el medio, en consecuencia la osteoinducción pudo ocurrir en mayor medida y en menor tiempo que usando membrana para este fin, pues a las 3 semanas en este estudio el porcentaje de ROG logrado cercano al 80%, superando el 25% que lograron los referidos autores⁵ usando membranas aún cuando el estudio se llevó a cabo en condiciones muy similares en tibias de la misma cepa animal.

Toda la evidencia proporcionada por las pruebas inferenciales permiten comprobar la tendencia observada en el análisis descriptivo de los datos radiográficos: las tibias tratadas con quitosano mostraron mayor porcentaje de ROG al finalizar el estudio que las tibias no tratadas. Esto concuerda con lo expresado por Danilchenko y col. 2011¹⁵⁵, quienes concluyen que los andamios de quitosano demostraron buenas propiedades osteoinductivas y que dichos andamios pueden usarse como sustitutos de tejido óseo. Sin embargo, es necesario diferir un poco de la opinión de estos autores pues el biomaterial no es un sustituto, más si constituye una matriz para rellenar provisionalmente el defecto y aminorar la tensión mecánica que el defecto óseo ocasiona en el área circundante a él, porque en condiciones de disolución de continuidad, el hueso es frágil y tardará en formar un tejido fibroelástico provisional para promover su reparación y con ello reponer su funcionalidad.

HALLAZGOS HISTOLÓGICOS CUALITATIVOS

Comportamiento histológico observado en el grupo experimental. Semana 3.



MADUREZ	MÉDULA	UNIÓN	PERIFÉRICA
0. Ausente 1. C. Indiferenciadas 2. Diferenciación 3. Inmaduro 4. Heterogéneo 5. Maduro	0. Ausente 1. Activa 2. Adipocítica 3. Amarilla	0. Ausente 1. Escasa 2. Moderada 3. Elevada 4. Casi total 5. Continuidad	0. Ausente 1. Escasa 2. Moderada 3. Elevada
5	1	4	3

Figura 31. Corte histológico (HE) de tibia experimental de Wistar que representa algunos indicadores sugerentes de regeneración ósea. Aumento de 10x. Fuente propia

En cuanto a la madurez ósea, en el preparado de la **figura 31** se ubica una zona grande central a manera de banda color rosa pálido, correspondiente a hueso maduro compacto (**HM**) con patrón homogéneo alternando con focos de mineralización osteoide. Se observan algunos osteocitos de reducido tamaño incluidos en dicha matriz y el espacio correspondiente a vasos sanguíneos (**VS**). Es una zona prototípica del grado 5, mayor nivel de madurez ósea propuesta en la escala de Heiplye.

Parte de los espacios vacíos aluden al grado de **unión ósea**, o como se encontraba la continuidad del defecto con el hueso normal (**HN**). En este sentido, predominó el nivel 4 o formación ósea casi total, es decir, Relleno mayor de 2/3 del defecto para la semana 3.

La **formación ósea periférica** para este mismo momento de evaluación, en el grupo experimental fue elevada. Está íntimamente relacionado a la unión ósea. En el preparado estas zonas están representadas con el círculo negro, observándose también como toda la capa celular que delimita los espacios blancos o el espacio correspondiente al remanente de defecto óseo, evidenciando una unión casi total.



MADUREZ	MÉDULA	UNIÓN	PERIFÉRICA
<i>0. Ausente</i> <i>1. C. Indiferenciadas</i> <i>2. Diferenciación</i> <i>3. Inmaduro</i> <i>4. Heterogéneo</i> <i>5. Maduro</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Activa</i> <i>2. Adipocítica</i> <i>3. Amarilla</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i> <i>4. Casi total</i> <i>5. Continuidad</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i>
5	1	4	3

Figura 32. Corte histológico (HE) de tibia experimental de Wistar donde se observan indicadores sugerentes de regeneración ósea. Aumento de 10x. Fuente propia.

La relación entre la cantidad de adipocitos y el resto de células del infiltrado inflamatorio permitió establecer el nivel de madurez de la médula ósea. Se consideró madura cuando predominaron las células adipocíticas en relación a la serie eritroide, por ejemplo una relación 30/70 indica presencia de un 30 % de infiltrado y 70% de adipocitos en el tejido de granulación.

En la **figura 32** del preparado histológico se observan indicadores tempranos de regeneración ósea, prototípicos del nivel 1 de la escala de Heiple. Se trata de una médula ósea hematopoyéticamente activa, o con presencia mayoritaria de eritrocitos

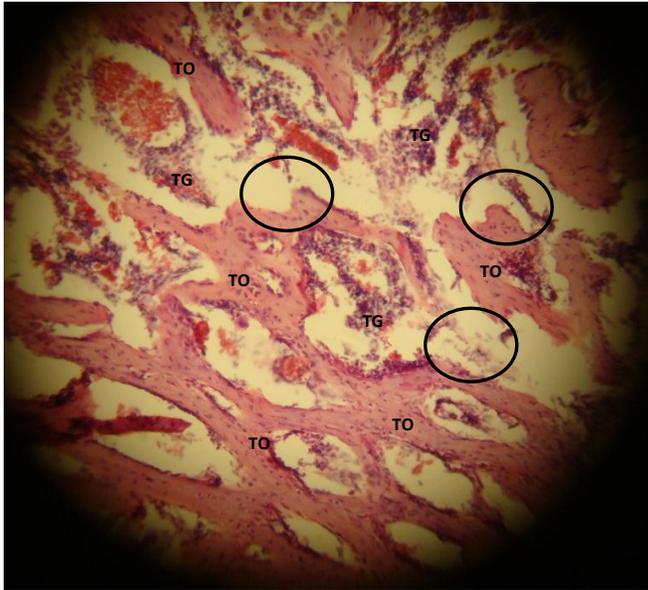
(80% plasmocitos/20% adipocitos), es decir, la calidad de la médula era ideal para el momento de la evaluación tan incipiente.

Se observan múltiples focos de tejido de granulación (**TG**), algunas de estas zonas se encuentran rodeando a un artefacto rosado oscuro refringente y acelular compatible con restos de liposoma de Quitosano (**LQ**). Contiguamente a estos focos de tejido de granulación e infiltrado inflamatorio se ubican algunas trabéculas óseas inmaduras (**TO**).

Esta gran cantidad de células de infiltrado inflamatorio indica una hiperactividad de la médula ósea en presencia de quitosano pero sin signos de reacción a cuerpo extraño, puesto que no se observan células gigantes multinucleadas, por lo que se presume de quimitaxis de elementos celulares que al cabo de estas tres semanas post implantación se están diferenciando en osteoblastos, responsables de la fabricación de matriz osteoide.

www.bdigital.ula.ve

COMPORTAMIENTO HISTOLÓGICO OBSERVADO EN EL GRUPO CONTROL. SEMANA 3.



MADUREZ	MÉDULA	UNIÓN	PERIFÉRICA
<i>0. Ausente</i> <i>1. C. Indiferenciadas</i> <i>2. Diferenciación</i> <i>3. Inmaduro</i> <i>4. Heterogéneo</i> <i>5. Maduro</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Activa</i> <i>2. Adipocítica</i> <i>3. Amarilla</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i> <i>4. Casi total</i> <i>5. Continuidad</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i>
5	1	1	1

Figura 33. Corte histológico (HE) de tibia control de Wistar donde se observan indicadores sugerentes de regeneración ósea. Aumento de **10x**.
Fuente propia

En el grupo control a las 3 semanas, se observó un conglomerado de tejido osteoide en forma de islas, correspondiendo a múltiples trabéculas óseas inmaduras (**TO**). En consecuencia se le adjudicó a la mayoría de los preparados controles el grado 5 de **madurez ósea**, aunque pareciera que se trata de un grado 4 de madurez, pues las trabéculas semejan espículas óseas uniendo los islotes de hueso inmaduro conformando un patrón heterogéneo. Sin embargo, el preparado de la **figura 33** también es **hueso maduro** pero su distribución no es homogénea y robusta como en el ejemplo del grupo experimental. Este patrón de las trabéculas típico en el grupo control podría atribuirse a que no existe un andamio que guíase la formación de tejido osteoide como ocurrió en el grupo experimental.

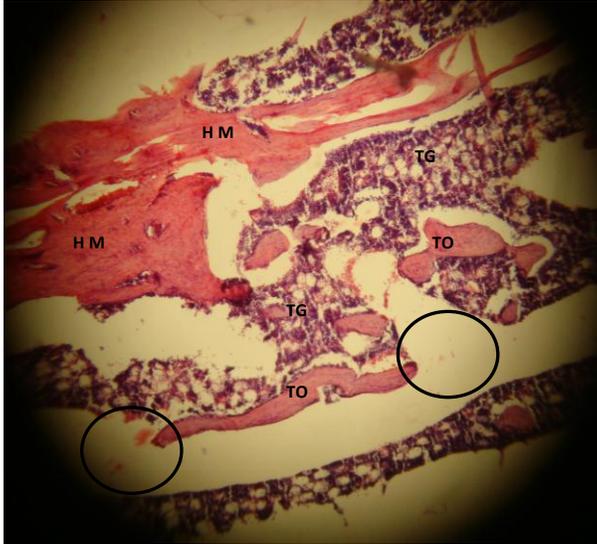
En torno a la calidad de la **médula ósea** la figura representa el común de lo visto en el grupo control, en el cual la médula ósea se consideró activa con importante presencia

de tejido de granulación (**TG**) en la mayoría de los casos pero en una cantidad un poco menor en relación a la elevadísima celularidad denotada en el grupo experimental. Esta menor expresión de plasmocitos es normal para el grupo control, obedece a que ante un cuerpo extraño en las primeras semanas estas células proliferan y prevalecen mientras se requiera que se diferencien en células promotoras de hueso como los osteoblastos para la deposición de matriz orgánica y posterior mineralización ósea.

En cuanto a la **unión y a la formación ósea periférica** las áreas encerradas en el círculo negro señalan la discontinuidad entre el hueso. Se observa así porque en el grupo control las trabéculas óseas no son continuas entre sí, ni con los bordes del defecto óseo, la formación ósea se observó escasa y discontinua.

www.bdigital.ula.ve

Comportamiento histológico observado en el grupo control. Semana 6.



MADUREZ	MÉDULA	UNIÓN	PERIFÉRICA
<i>0. Ausente</i> <i>1. C. Indiferenciadas</i> <i>2. Diferenciación</i> <i>3. Inmaduro</i> <i>4. Heterogéneo</i> <i>5. Maduro</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Activa</i> <i>2. Adipocítica</i> <i>3. Amarilla</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i> <i>4. Casi total</i> <i>5. Continuidad</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i>
3 y 5	1	1	1

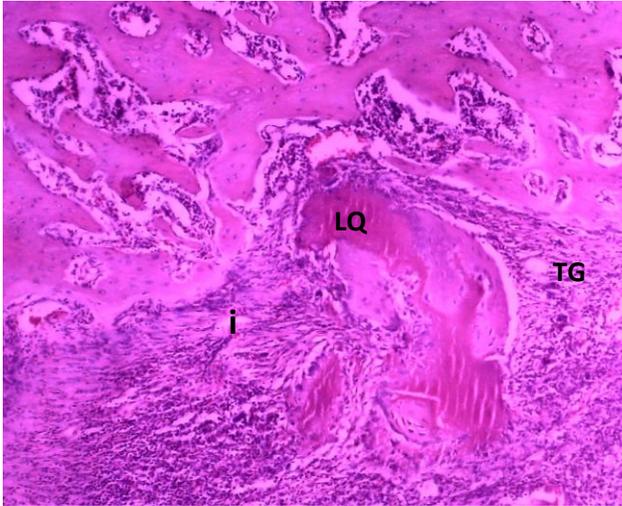
Figura 34. Corte histológico (HE) de tibia control de Wistar. Aumento de 10x. Fuente propia.

En la **figura 34** se representa el grado 5 de **madurez ósea** de acuerdo a la escala de Heiple en dos grandes zonas en las que se observa hueso maduro (**HM**) con algunos vasos sanguíneos y osteocitos incluidos. Pero en otras zonas se observan trabéculas óseas inmaduras (**TO**) correspondientes al grado 3 de madurez ósea.

La **médula ósea** en este preparado de ejemplo es activa pero con mayor cantidad de adipocitos (20% plasmocitos/80% adipocitos) que lo observado en la semana 3. Esto es indicativo de que a medida que avanzó el tiempo la médula fue sustituyendo alguno de sus componentes celulares por células adiposas y es representativo de una médula ósea madura.

De igual manera este corte histológico realizado a la semana 6, evidencia falta de **continuidad** entre hueso nativo y el neoformado, y por tanto escasa **formación ósea periférica** señalándose en los espacios vacíos con el círculo negro.

Comportamiento histológico observado en el grupo experimental. Semana 6.



MADUREZ	MÉDULA	UNIÓN	PERIFÉRICA
<i>0. Ausente</i> <i>1. C. Indiferenciadas</i> <i>2. Diferenciación</i> <i>3. Inmaduro</i> <i>4. Heterogéneo</i> <i>5. Maduro</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Activa</i> <i>2. Adipocítica</i> <i>3. Amarilla</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i> <i>4. Casi total</i> <i>5. Continuidad</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i>
5	1	2	3 (50%)

Figura 35. Corte histológico (HE) de tibia experimental de Wistar. Aumento de **10x**. Fuente propia.

www.bdigital.ula.ve

En el grupo experimental la **médula ósea** tuvo una importante actividad en la semana 6, incrementándose la porción de infiltrado inflamatorio (**I**) alrededor de los restos de liposoma de quitosano. Este fondo color violeta entremezcla al tejido de granulación.

Estas células rodearon al liposoma de quitosano en el grupo experimental puesto que en principio deben reconocerlo, cercarlo mientras se acoplan si a él si el biomaterial es biocompatible; para biodegradarlo posteriormente, de modo que no quede incluido como un cuerpo extraño generando un granuloma de cuerpo extraño. Por ende, en las siguientes evaluaciones se debería observar actividad celular alrededor del liposoma hasta tanto sigan apareciendo trazas del biomaterial.

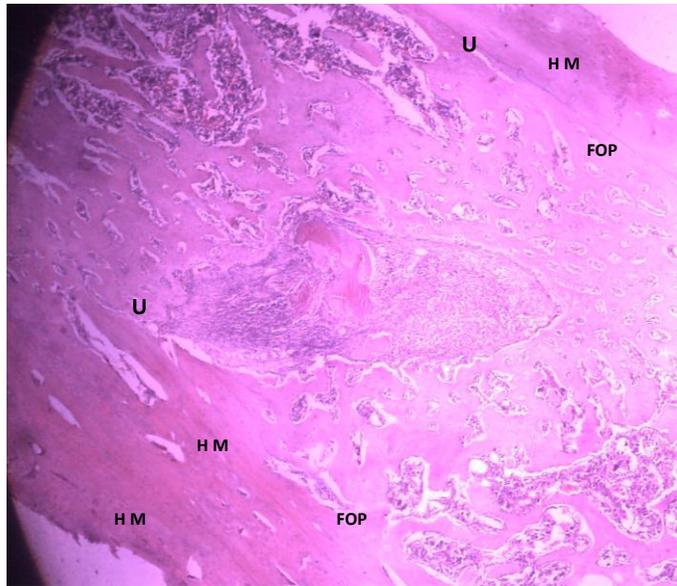
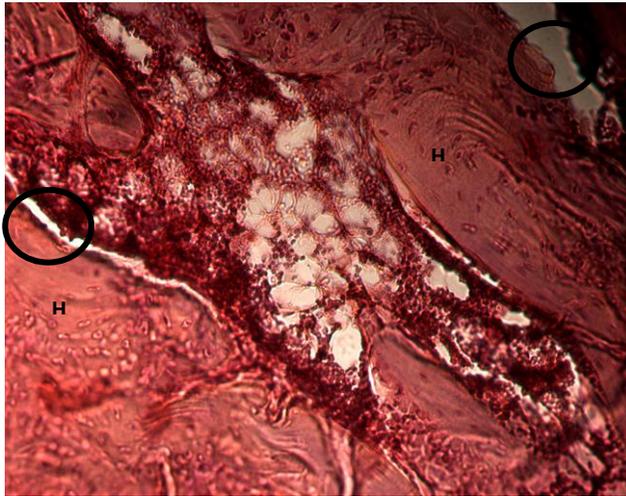


Figura 36. Corte histológico (HE) de tibia experimental de Wistar.
Aumento de **10x**. Fuente propia

En la figura 36, se puede apreciar que la imagen característica de la **madurez ósea** grado 5 o hueso maduro (**HM**) compacto, que predominó en todos los casos experimentales, se representa en este corte histológico como la banda color rosa homogénea en la zona inferior de la fotografía y en otra banda superior derecha.

Así mismo la **formación ósea periférica** que se denota en el corte de la figura 36 como **FOP** es elevada, presentándose este hallazgo sólo en el 50% de los casos experimentales. Esta formación ósea desde los márgenes del defecto propició en la mayoría un nivel moderado de **unión**, pero en un 25% de los casos ocurrió una casi continuidad como la observada en los márgenes del defecto de la presente imagen (**U**).

Comportamiento histológico observado en el grupo control. Semana 9.

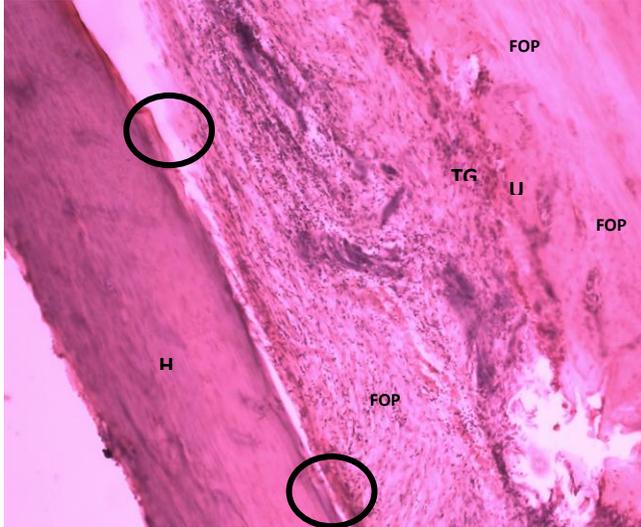


MADUREZ	MÉDULA	UNIÓN	PERIFÉRICA
<i>0. Ausente</i> <i>1. C. Indiferenciadas</i> <i>2. Diferenciación</i> <i>3. Inmaduro</i> <i>4. Heterogéneo</i> <i>5. Maduro</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Activa</i> <i>2. Adipocítica</i> <i>3. Amarilla</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i> <i>4. Casi total</i> <i>5. Continuidad</i>	
5	1	1	1

Figura 37. Corte histológico (HE) de tibia control de Wistar. Aumento de 20x. Fuente propia.

En el grupo control ya para la semana 9 se observan zonas más grandes y heterogéneas de hueso compacto maduro (HM) bordeando la porción medular. En cuanto a la médula ósea sigue siendo activa pero con 50% de presencia de adipositos (50/50). Los círculos negros indican las brechas que existen entre el hueso maduro y las trabéculas óseas neoformadas, siendo evidente la escasa unión en todos los cortes histológicos del grupo al cabo de las 9 semanas. De la misma forma la formación periférica es escasa por lo que condiciona que no exista continuidad con el hueso circundante. (figura 37)

Comportamiento histológico observado en el grupo experimental. Semana 9.



MADUREZ	MÉDULA	UNIÓN	PERIFÉRICA
<i>0. Ausente</i> <i>1. C. Indiferenciadas</i> <i>2. Diferenciación</i> <i>3. Inmaduro</i> <i>4. Heterogéneo</i> <i>5. Maduro</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Activa</i> <i>2. Adipocítica</i> <i>3. Amarilla</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i> <i>4. Casi total</i> <i>5. Continuidad</i>	<i>0. Ausente</i> <i>1. Escasa</i> <i>2. Moderada</i> <i>3. Elevada</i>
5	1	2	3

Figura 38. Corte histológico (HE) de tibia control de Wistar. Aumento de 10x. **Fuente propia**

En la figura 38 se observa reparación del defecto óseo con presencia de **hueso maduro (HM)** homogéneo. La **actividad de la médula** continúa pero ya abraza menos zonas comparada con las primeras semanas lo que podría sugerir que el tejido se encuentra en fase quiescente. Sin embargo en algunas cortes persiste el liposoma y la reacción del infiltrado inflamatorio alrededor (figura 39).

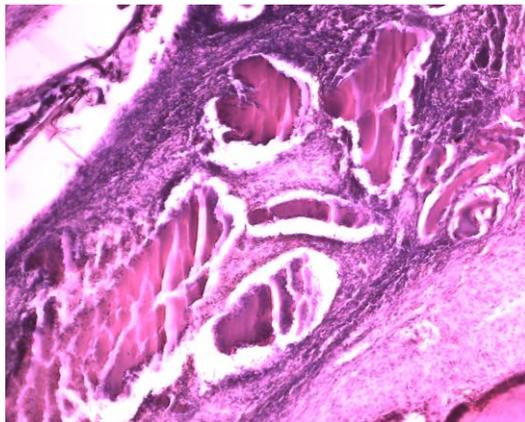


Figura 39. Corte histológico (HE) de tibia control de Wistar. Aumento de 20x. **Fuente propia**

En cuanto a la **continuidad**, en la figura 38 se aprecia que a pesar de la madurez del tejido aún se observan microbrechas entre el tejido neoformado y el hueso que

rodeaba el defecto óseo, defecto que no se observa en el corte puesto que ya la matriz osteide reemplazó el espacio y en muchos casos por hueso maduro; es decir, existe **formación ósea periférica** elevada.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA CUANTITATIVA.

- **Madurez ósea**

De acuerdo con la escala de Heiplye tomada en cuenta para valorar la ROG en los preparados histológicos, el primer criterio histológico a evaluar es la **madurez ósea**. En lo concerniente a esto, lo deseable es que las áreas del defecto logren recuperarse hasta alcanzar la madurez ósea completa o formación de hueso maduro. Este nivel de madurez fue superior en el grupo control, detectada en el 100% de los preparados histológicos de las muestras para la **primera evaluación**. Pero en la **segunda evaluación**, cambia la relación y predomina este parámetro en el grupo experimental, diagnosticándose en el 75% de las muestras observadas. En la **tercera evaluación** la frecuencia de la madurez ósea se iguala con 90% para cada grupo. (Gráfico 6a)

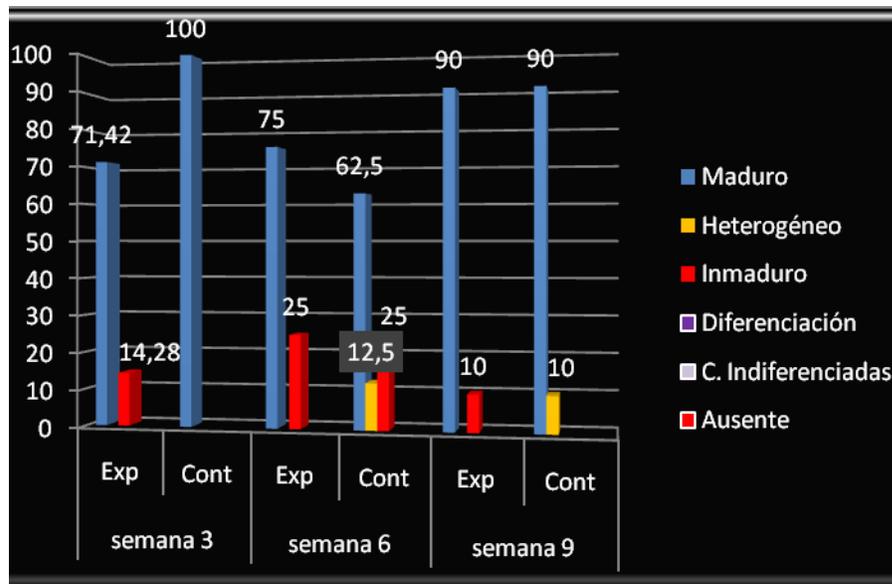


Gráfico 6a. Grado histológico de madurez ósea.

Por otra parte, cuando se analiza el comportamiento de este mismo parámetro en ambos grupos de forma global, se observa que la madurez ósea se alcanzó a lo largo del estudio en el 84% de los casos del grupo control y en el 80% de los preparados en el grupo experimental. (Gráfico 6b)

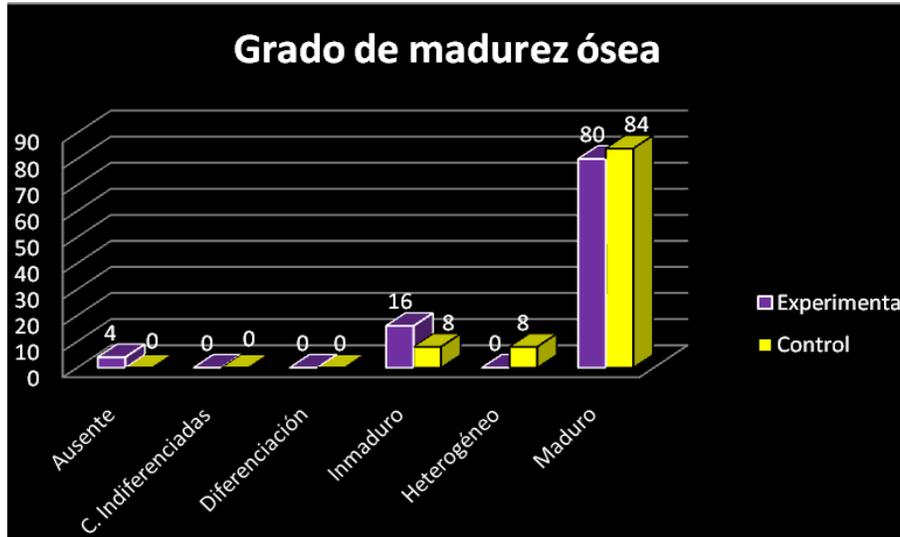


Gráfico 6b. Promedio de Madurez ósea a lo largo del estudio.

Se desconoce la explicación al comportamiento de los datos en este parámetro, pero se presume que el descenso de los casos con madurez ósea entre la **primera** y la **segunda evaluación** puede deberse al mecanismo de remodelación ósea que sigue a la fase de mineralización o neoformación ósea. Pero independientemente del grupo (control o experimental), para la **tercera evaluación** se iguala la frecuencia en la madurez ósea, lo que puede indicar que para ese modelo animal, para el cual no está establecido **el tiempo de regeneración ósea espontánea**, este proceso presuntivamente **se completa después de 9 semanas** de ocurrida la injuria o lesión ósea.

La cantidad y extensión de la **aposisión ósea** que fue diagnosticada radiográficamente **se confirmó histológicamente**, pues se pudo diferenciar que tipo de tejido se formó en dicha zonas: mineralización osteoide y tejido óseo maduro. Aunque numéricamente en el análisis histológico no se aprecian diferencias entre

grupos control y experimental, en el análisis cualitativo de los preparados pudo diferenciarse que en los caso **donde se implantó el liposoma, el tejido observado era tejido óseo maduro**, en tanto que, **en la mayoría de los casos controles** en el preparado histológico **se observaban focos de tejido osteoide o de mineralización**. No obstante, para el cómputo de los datos en la escala de Heiply se consideraban ambas formas de tejido como madurez ósea, pero en la realidad los focos de mineralización son solo centros iniciales de mineralización; mientras que trozos de tejido óseo maduro en toda su extensión como ocurrió en el grupo experimental, es el ideal

La madurez ósea en presencia de los liposomas de quitosano expresa la utilidad del quitosano como andamio para la regeneración de defectos; tal y como ya lo habían confirmado Chang y cols. en el 2007³⁵, quienes injertaron scaffolds de quitosano en defectos osteoarticulares en ratones y doce semanas después observaron que los defectos fueron reparados con cartílago hialino, a partir de colágeno tipo II y proteoglicanos confirmados por pruebas de inmunohistoquímica.

El colágeno tipo II es el componente fundamental de la red inicial que se forma en el espacio del defecto, red que posteriormente se mineralizará para sufrir cambios de remodelado de su arquitectura y culminar en hueso maduro. Tanto en el estudio de Chang y cols³⁵ como en la presente investigación se constató la presencia de cartílago hialino, colágeno en los preparados del grupo tratado con quitosano, pero a diferencia de aquel estudio, en ésta investigación se logró observar amplias zonas de hueso maduro.

No obstante, estos hallazgos difieren de los observados por Campo y col. 2011⁵, ya que estos autores no encontraron diferencias significativas entre el grupo de ratas tratadas con membrana de quitosano y el grupo al que se le implantó membranas de quitosano con hidroxiapatita; a pesar de ello los autores afirman que el uso de las membranas a base de quitosano con y sin hidroxiapatita permite el incremento de las características de ambos biomateriales, lo que trae consigo un mejor rendimiento en el proceso de la ROG.

Las diferencias entre ambos estudios tal vez se deban a la forma física del quitosano, pudiéndose presumir que para reparar defectos óseos de tamaño crítico, es más recomendable implantar liposomas que logren llenar el área del defecto y no solo una membrana que actúe principalmente aislando el tejido conjuntivo del defecto.

Este razonamiento cobra sentido cuando se asume que además de obtener mayor cantidad del biomaterial en contacto con el tejido, por su forma de hidrogel, éste libera con mayor rapidez su principio activo, razón por la que en el estudio de Chang y col. 2007³⁵, la tinción de abundantes proteoglicanos fue observada, pues una de las razones por las que el quitosano es biocompatible, bioadhesivo, bioactivo y estimulante la regeneración de los tejidos, se debe a la similitud de su estructura química con los proteoglicanos, estructuras imprescindibles que promueven muchas de las funciones de reparación de los órganos.

- **Calidad de la médula ósea**

Otro criterio de suma importancia para constatar la eficacia de la neoformación ósea es la *calidad de la médula ósea*. Aunque no lo parezca, lo deseable en este caso es la presencia de médula activa, pues indica hematopoyesis y garantiza una tasa constante de actividad celular regenerativa. La presencia de médula ósea amarilla o bien una médula adipocítica no es ideal, y solo debería estar presente cuando existe un desequilibrio patológico de los adipocitos en la sustancia medular.

Respecto a lo anterior, en la **primera evaluación (semana 3)** en el grupo experimental se observó presencia de médula ósea activa en el 71,43% de los preparados, 75% en la **segunda evaluación (semana 6)** y 100% de actividad de la médula ósea al cabo de **9 semanas (tercera evaluación)**. Mientras que en el grupo control la presencia de médula ósea activa decreció entre la **semana 3** y la **semana 6**, del 100% al 75% respectivamente. En la evaluación de **la semana 9** para el grupo control la actividad de la médula se detectó en el 80% de los preparados histológicos del grupo control. (Gráfico 7a)

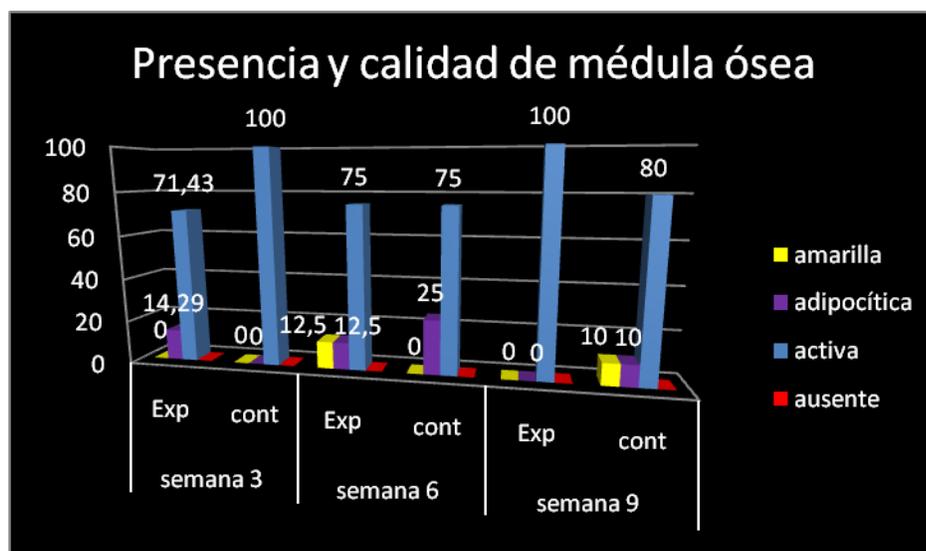


Gráfico 7a.Calidad de la médula ósea para cada momento evaluado.

Al analizar el anterior parámetro de forma acumulativa, a lo largo del estudio, se encontró que existe paridad entre el grupo control y experimental (84% para cada uno) en lo referido a la presencia de médula ósea activa. Esto puede estar indicando que, los cambios en esta frecuencia solo son perceptibles si se analizan en cada momento evaluativo y no como sumatoria de todos los casos a lo largo del estudio.(Gráfico 7b)

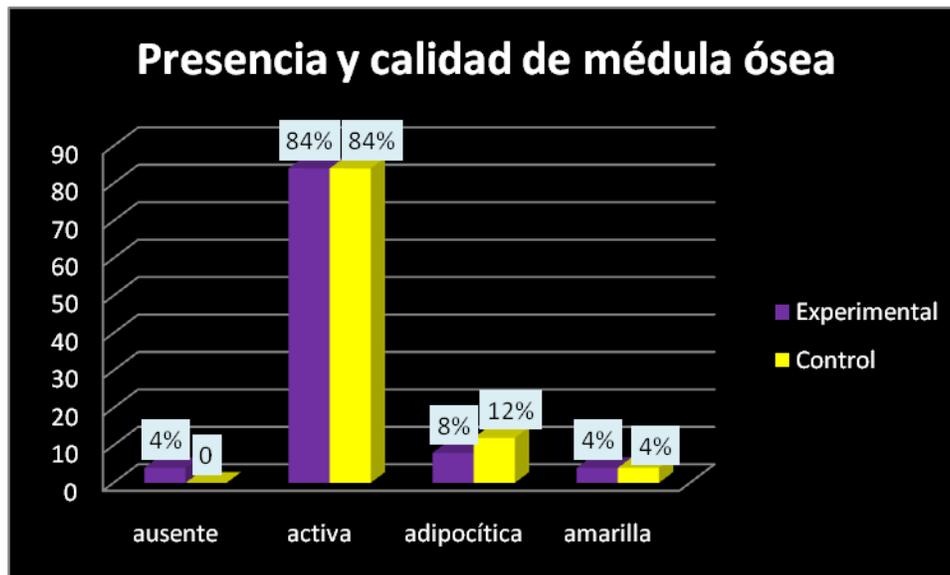


Gráfico 7b. Calidad de la Médula ósea en ambos grupos.

Cabe recalcar que una elevada actividad de la médula ósea como la que fue observada con mayor frecuencia en el grupo experimental, indica la bioestimulación que el quitosano provoca en las células indiferenciadas provenientes del periostio, endostio y de la médula misma, bioactivando su transformación en fibroblastos y osteoblastos, tal como lo afirmaron Rao y cols. en el 2009¹⁵⁶ y Niu y cols. en el 2011¹⁵⁷.

- **Continuidad del defecto con el hueso circundante**

En torno a este parámetro, se observó un comportamiento atípico pues en la **primera evaluación** a la **semana 3** solo se detectó continuidad en el grupo experimental en el 42,86%, seguida de una casi total continuidad en el resto de los preparados experimentales. Comparando con el grupo control, se observó que predominó en esta evaluación moderada continuidad en el 28,57% y el mismo porcentaje para escasa continuidad.

En la **segunda evaluación (semana 6)** siguió predominando la continuidad en el grupo experimental con 50% de casos de continuidad moderada y un 25% de

continuidad casi total. Para la **tercera evaluación (semana 9)** se halló continuidad moderada en un 40% en el grupo experimental, y en un 10% para el grupo control. (Gráfico 8a)

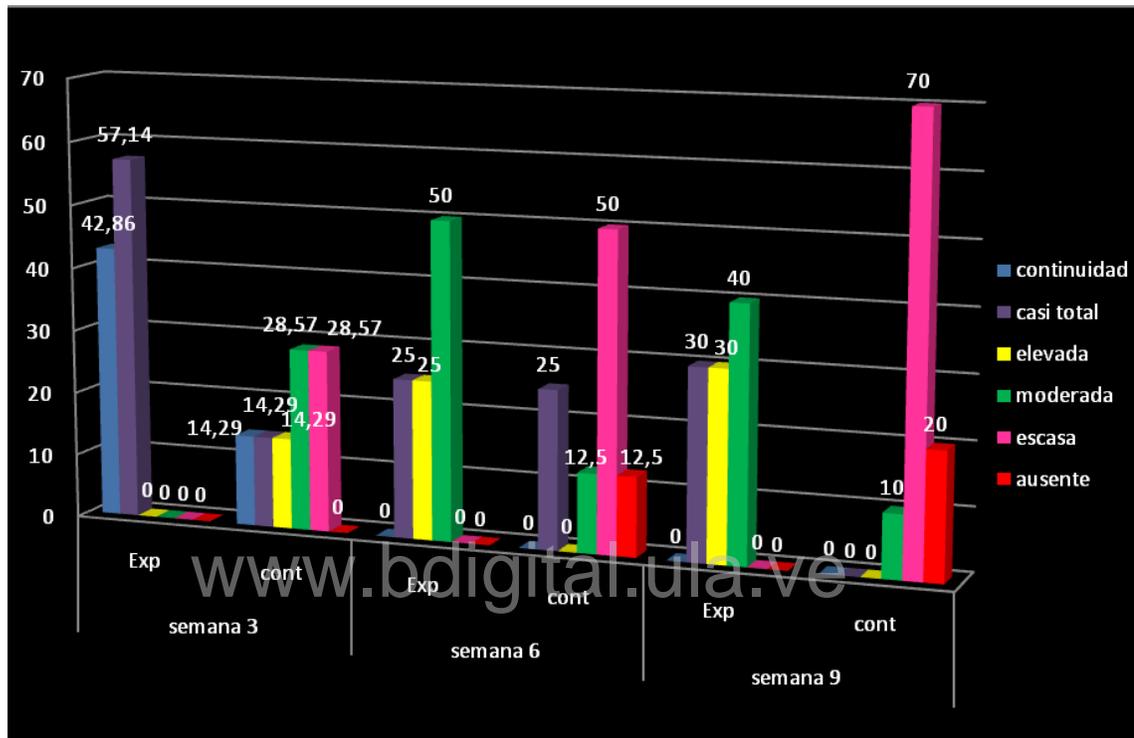


Gráfico 8a. Nivel de continuidad del defecto con el hueso circundante para cada evaluación.

Sin embargo, si se analizan en conjunto todos los casos, se sigue observando un comportamiento más favorable para el grupo experimental, en el cual los promedios de los niveles de continuidad moderada, elevada, y casi total, fueron mayores que en el grupo control. La continuidad total se observó en pequeños sectores de ambos grupos, visto en el 8% en el grupo experimental y apenas en un 4% del grupo control. (Gráfico 8b)

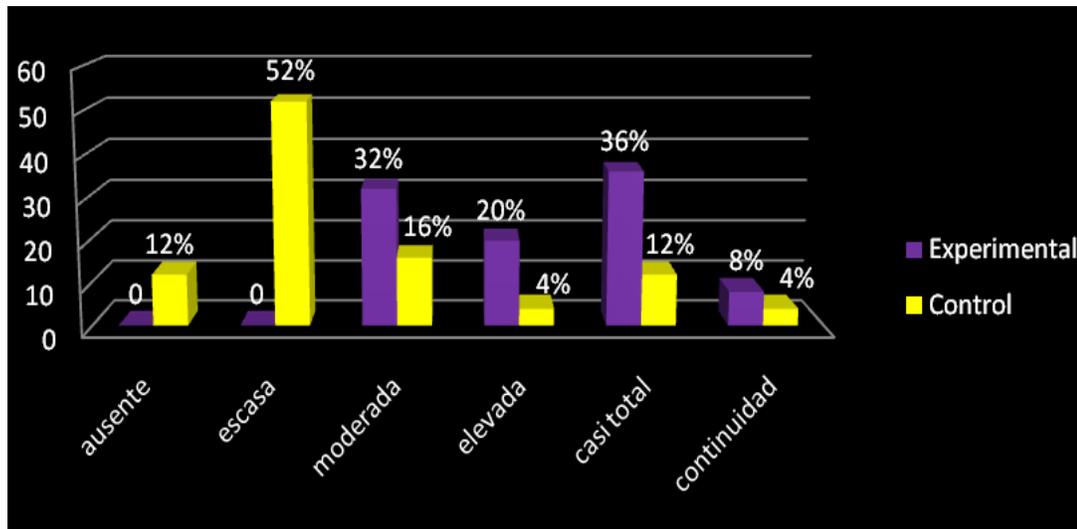


Gráfico 8 b. Continuidad del defecto óseo con el hueso circundante

La continuidad que radiográficamente se había observado en elevada frecuencia, histológicamente se constató en una parte muy pequeña de la muestra. Posiblemente esto responde al proceso tan agresivo de desmineralización utilizando ácido nítrico, que pudo barrer con zonas de aposición mineral que no alcanzó la madurez ósea y que justamente puede ubicarse en los márgenes del defecto. Sin embargo, si se observa detalladamente el comportamiento de ambos grupos en cada período de evaluación, se aprecia que en el grupo experimental predominó el nivel moderado y por tanto siempre se acercó más al nivel de continuidad que el control, representando otro indicio claro de la estimulación proporcionada por el liposoma de quitosano. Sobre este aspecto específico no se encontraron antecedentes con los que lograrse comparar el hallazgo. Sin embargo, esta continuidad histológicamente fue percibida y asociada a la presencia en algunos casos de fragmentos del quitosano, alrededor y por encima del cual se observó siempre una elevada concentración de células osteoblásticas activas. Esta elevadísima adhesión celular explica la

biocompatibilidad del biomaterial, pues las células se adhieren y proliferan sobre estas porciones de quitosano.

- **Formación ósea periférica**

El nivel de formación ósea se evaluó para cada grupo, observándose elevada formación ósea periférica en el grupo experimental con predominio sobre el grupo control en todas las evaluaciones. Puntualmente en la **primera evaluación (semana 3)** la formación ósea fue elevada en el 85,7% de los preparados experimentales en contraste con el 14,3% para el grupo control. No obstante, este nivel decayó en el grupo experimental para la **segunda evaluación (semana 6)** ubicándose en el 50% de los preparados experimentales, y aumentó en el grupo control (25%). En la **tercera evaluación (semana 9)** se observó elevada formación ósea periférica en el 70% de los casos en el grupo experimental, y en relación a esto en el grupo control se observó el mismo porcentaje (70%) pero para la categoría escasa.(Gráfico 9a)

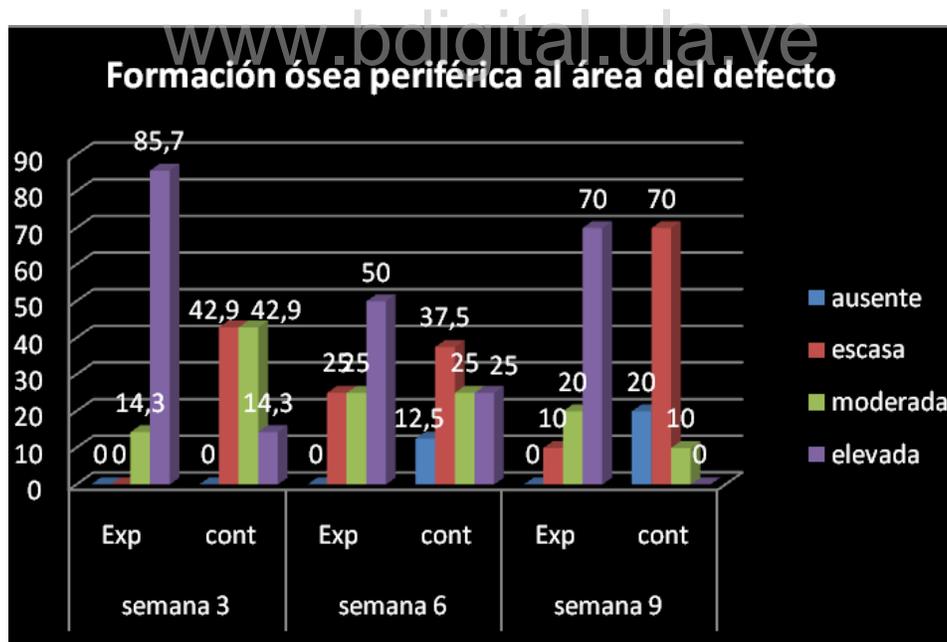


Gráfico9a. Formación ósea desde los márgenes del defecto.

En consecuencia cuando se observa de forma global el comportamiento del parámetro para cada grupo, se halla un predominio en el grupo experimental (64%) que en el grupo control (12%) en el mismo momento evaluativo. (Gráfico 9b)

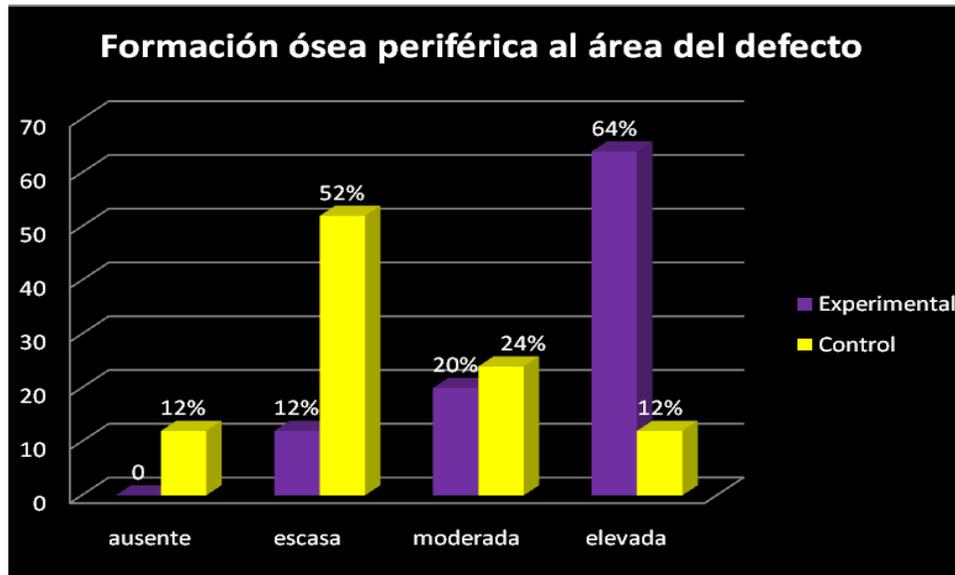


Gráfico 9b. Formación ósea periférica. Frecuencia global.

La formación ósea periférica tiene fuerte vinculación con la continuidad, dado que la formación ósea periférica al área del defecto permite el cierre del defecto. Cuando la neoformación se inicia a partir de la capa celular que tapiza la periferia del hueso o periostio, el cierre será desde ese exterior u osificación intramembranosa. Aunque también puede ocurrir a partir de un molde de tejido cartilaginoso, cartílago hialino que será reemplazado por tejido óseo; proceso conocido como osificación endocondral, en el cual el cierre sucede desde el interior al exterior; o bien de forma concéntrica u osificación pericondral (desde el exterior del cartílago).

Pero en el caso de esta investigación, cuando se implanta un biomaterial dentro de un lecho óseo, esta neoformación pudiera darse desde dos direcciones, en primer lugar desde la capa celular periférica hacia el centro (intramembranosa); y casi simultáneamente desde el biomaterial, que actúa como matriz, un molde que guía el proceso hasta el hueso maduro, tal como sucede en la osificación endocondral.

Con respecto a cual es el tipo de proceso de osificación que ocurre ante la implantación de Quitosano, existe controversia. Por un lado Jiang y col. 2010¹⁵⁸, observaron escasa presencia de cartílago en osificación en las muestras tratadas con microesferas de Quitosano, concluyendo que el proceso de osificación que se induce el biomaterial es intramembranoso, y por otra parte, Chang y cols³⁵ confirman la presencia de cartílago hialino formado en sitios de implantación de quitosano, fallando a favor de la osificación endocondral. Entonces estos antecedentes, abren el abanico de posibilidades y de acuerdo a lo observado en los preparados de la presente investigación, **se cree que el proceso de crecimiento óseo puede ocurrir en ambas direcciones del andamio, por ende pudiese verse potenciado, lo que explica que en el grupo experimental se manifestase un mayor nivel de continuidad y de formación ósea en la periferia.**

Así también, la aceleración del proceso de regeneración ósea que ya se presumía radiográficamente fue constatada histológicamente en esta investigación. Estos hallazgos son consistentes con la investigación de Miranda y cols. 2011³⁸, quien utilizó un andamio de gel poroso de quitosano, para el desarrollo y la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales de la médula ósea, insertando el gel en alvéolos dentarios de ratas.

La autora obtuvo como resultado que este material promueve la adhesión, difusión, viabilidad y diferenciación osteogénica de dichas células. Esta estimulación tiene lugar por el carácter policationico del quitosano, que le propicia unión electrostática con los glucosaminoglicanos (moléculas aniónicas) y también enlazar con factores de crecimiento (moléculas señalizadoras), produciendo la estimulación de diversas células, en gran medida estimula los fibroblastos, promotores de angiogénesis, y a mayor nutrición vascular, más rápida ocurre la reparación. Además dicho estímulo fibroblástico acelera la formación de médula ósea, deposición de matriz colágena, que luego será mineralizada (matriz osteoide) y remodelada hasta conformar hueso maduro.

Esta reflexión coincide con lo manifestado por Kung y cols., 2011¹⁵⁹ acerca del efecto osteoinductivo del Quitosano en la periferia de implantes de titanio en

ratas, pues atribuyen el efecto a que el biomaterial promueve la diferenciación celular en osteoblastos, favorece el aumento de trabéculas óseas e incrementa la formación de médula ósea. Finalmente, esta forma física de liposoma usada en la presente investigación podría determinar una biodegradación lenta con liberación sostenida de los productos químicos asociados al quitosano, razón por la cual podría ser utilizado con gran éxito en la fabricación de andamios bioactivos para guiar la regeneración ósea.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Como respuesta al objetivo general se tiene que el uso de liposomas de quitosano en defectos óseos en tibias de ratas *Wistar* como andamios para la ROG promueve la neoformación ósea en menor tiempo que el tiempo que tarda en regenerar un defecto en condiciones fisiológicas naturales, por lo tanto es eficiente para la ROG.
- Radiográficamente tanto a las 3, 6 y 9 semanas de evaluación desde el punto de vista cualitativo el liposoma de quitosano tuvo mayor eficiencia para la ROG en los defectos óseos.
- Del análisis radiográfico cuantitativo, se infiere que el liposoma de quitosano promovió mayor porcentaje de extensión de la ROG en cada una de las semanas de evaluación, manteniendo una tendencia creciente en el tiempo con porcentajes cercanos al 100% para la última semana de evaluación.
- El análisis estadístico inferencial de los datos permitieron evidenciar que existen diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de ROG obtenida en el grupo control y experimental, siendo mayor en el grupo tratado con liposoma de quitosano.

- Histológicamente se corroboraron las diferencias observadas radiográficamente, pudiéndose establecer que en el grupo experimental se observaron las mejores respuestas del tejido y una mayor frecuencia de parámetros celulares sugerentes de ROG, razones por las cuales se reafirma la eficiencia del liposoma indicado para este fin, ya que estimula la diferenciación celular y la madurez ósea en menor tiempo que en condiciones naturales.

Se recomienda:

- Ejecutar el mismo estudio por un período de evaluación más largo, para observar cuanto tiempo tarda en lograrse en su totalidad la regeneración de los defectos óseos tratados y no tratados.
- Aumentar el tamaño muestral de los animales de experimentación para hacer más evidentes las diferencias intra e intersemanales entre los grupos control y experimental
- Realizar el análisis radiográfico usando programas imagénológicos más específicos como el Image J®, a fin de obtener medidas numéricas de la radiopacidad y su verificación con las obtenidas del hueso en condiciones fisiológicas habituales.
- Reproducir el estudio en defectos óseos maxilares, en el área de cirugía bucal, pues una vez corroborada su biocompatibilidad y eficacia para ROG en animales de experimentación puede valorarse la utilidad del biomaterial en seres humanos.

ANEXO A.

FICHA DE OBSERVACIÓN PARA EVALUAR LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL ANIMAL.

Fecha de la evaluación: _____

Momento de la evaluación: Semana 3 ____ Semana 6 ____ Semana 9 ____

De los siguientes ítems seleccionar con una equis (X) de acuerdo a la indicación del animal

www.bdigital.ula.ve

Marcaje: Rata nº: _____ Sexo: Femenino ____ Masculino ____

Oreja cortada _____ borde de la oreja sin corte _____

Fecha de la cirugía: _____ turno: mañana ____ tarde _____

EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL ÁREA INTERVENIDA.

Estado general del animal:

Aspecto de la herida.

Códigos: 0 =Ausente 1=Presente

www.bdigital.ula.ve

Parámetros cénicos	Edema	Eritema	Sangrado	Exudado	Colecciones	Deshicencia de los bordes	Extrusión de la membrana
Pata izquierda (Experimental)							
Pata derecha (control)							

ANEXO B.

**FICHA DE OBSERVACIÓN PARA EVALUAR LA EFICIENCIA DEL QUITOSANO EN LA REGENERACIÓN ÓSEA
GUIADA.**

CRITERIOS RADIOGRÁFICOS CUANTITATIVOS.							
SEMANA 3							
RATA Nº	ÁREA INICIAL	ÁREA FINAL/ CONTROL	ÁREA FINAL/ EXPERIMENTAL	REDUCCIÓN/ CONTROL	REDUCCIÓN/ EXPERIMENTAL	Porcentaje de ROG CONTROL	Porcentaje de ROG EXPERIMENTAL
EVALUACIÓN RADIOGRÁFICA. Observar las imágenes radiográficas a continuación e indicar los criterios solicitados.							
Fotografía de la radiografía periapical de la pata izquierda				Fotografía de la radiografía periapical de la pata derecha			
Medida de longitud _____				Medida de ancho _____			
Medida de longitud _____				Medida de ancho _____			
	<i>mm²</i>	<i>mm²</i>	<i>mm²</i>	<i>mm²</i>	<i>mm²</i>	<i>reducción*100/área inicial</i>	<i>reducción*100/área inicial</i>
1							

2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							

www.bdigital.ula.ve

SEMANA 6

1							
2							
3							
4							
5							

6							
7							
8							
SEMANA 9							
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							

www.bdigital.ula.ve

CRITERIOS RADIOGRÁFICOS CUALITATIVOS.

SEMANA 3

RATA N°	RADIOPACIDAD CONTROL	RADIOPACIDAD EXPERIMENTAL	CONTINUIDAD/CONTROL	CONTINUIDAD/EXPERIMENTAL	MINERALIZACIÓN/CONTROL	MINERALIZACIÓN/EXPERIMENTAL
	<i>0. Ausente 1. Presente</i>	<i>0. Ausente 1. Presente</i>	<i>0. No 1. Si</i>	<i>0. No 1. Si</i>	<i>0. Escasa (menor al 50%) 1. Moderada (50%-80%) 2. Abundante (mayor al 80%)</i>	<i>0. Escasa (menor al 50%) 1. Moderada (50%-80%) 2. Abundante (mayor al 80%)</i>
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						

SEMANA 6

1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						

www.bdigital.ula.ve

SEMANA 9

1						
2						
3						
4						
5						
6						

7						
8						

www.bdigital.ula.ve

PARÁMETROS HISTOLÓGICOS

SEMANA 3

RAT A N°	MADUREZ/ CONTROL	MADUREZ/ EXPERIMENTAL	MÉDULA/ CONTROL	MÉDULA/ EXPERIMENTAL	UNIÓN/ CONTROL	UNIÓN/ EXPERIMENTAL	PERIFÉRICA/ CONTROL	PERIFÉRICA/ EXPERIMENTAL
		0. Ausente 1. C. Indiferenciadas 2. Diferenciación 3. Inmaduro 4. Heterogéneo 5. Maduro	0. Ausente 1. C. Indiferenciadas 2. Diferenciación 3. Inmaduro 4. Heterogéneo 5. Maduro	0. Ausente 1. Activa 2. Adipocítica 3. Amarilla	0. Ausente 1. Activa 2. Adipocítica 3. Amarilla	0. Ausente 1. Escasa 2. Moderada 3. Elevada 4. Casi total 5. Continuidad	0. Ausente 1. Escasa 2. Moderada 3. Elevada 4. Casi total 5. Continuidad	0. Ausente 1. Escasa 2. Moderada 3. Elevada
1								
2								
3								
4								
5								
6								

7								
8								
9								

SEMANA 6

1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								

SEMANA 9

1								
---	--	--	--	--	--	--	--	--

www.bdigital.ula.ve

2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								

www.bdigital.ula.ve

Diagnóstico

histopatológico: _____

Observaciones adicionales: _____

Evaluar: _____

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de la Rosa M, Cepeda J. Regeneración ósea guiada de cara al año 2000. Consideraciones clínicas y biológicas. Rev ADM 2000; 57(4): 147-53.
2. Estrada C, Paz A, López L. Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. Rev EIA. 2006; 5: 93-100
3. Hardingham, T; Tew, S y Murdoch, A. Tissue engineering : chondrocytes and cartilage. Arthritis Res 2002;4 (Suppl 3):S63-S68.
4. Agrawal C, Ray R. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. J Biomed Mater Res. 2001; 55(2): 141-50.
5. Campo, M; Contreras, C. . Efectividad de membranas de quitosano con y sin hidroxiapatita para la regeneración ósea guiada. [Tesis]. Facultad de Odontología-Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela; 2011.
6. Simion M, Fontana F, Rasperini G, Maiorana C. Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluoroethylene membrane and a combination of intraoral autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio Oss). Clin Oral Implants Res. 2007; 18(5): 620–9.
7. Suárez D, García C, Yépez J, González A, Velazco G. Regeneración Osteomucosa con Membrana de Quitosano: Reporte de un Caso. [revista en internet]REDOE. 2011. [Citado el 26 de Julio de 2011]. Disponible en:
8. Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. Int J Periodontics Restorative Dent. 1994; 14(2): 166-80.
9. Harish,K., Tharanathan,R. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. Trends in Food Science & Technology. March 2007. 18 (3): 117-131.
10. Jorquera R, Jorquera O, Rivera S. Quitosano: Un material con Propiedades regenerativas y su Aplicación Clínica [internet]. REDOE. 2008 [Citado el 10 de Julio de 2010]. Disponible en: <http://www.redoe.com/ver.php?id=100>

11. Lárez C. Quitina y Quitosano: Materiales del pasado para el presente y el futuro. *Rev Avances en Química*. 2006;1(2):15-21
12. Lárez C. Algunos Usos del Quitosano en Sistemas Acuoso. *Rev Iberoamericana de Polímeros*. 2003;4(2):91-109
13. Veiga M, Ruiz R. El Quitosano: Usos farmacéuticos y biológicos. *Rev OFIL*. 2004;14(2):33-42
14. Akman A, Tıǧlı R, Gümüřderelioǧlu M, Nohutcu R. bFGF-loaded HA-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A*. 2010;92A(3):953-962
15. Yufeng Z, Yining W, Bin S, Xiangrong C. A platelet-derived growth factor releasing chitosan/coral composite scaffold for periodontal tissue engineering [Resumen]. *Biomaterials*. 2007; 28(8): 1515-1522.
16. Park J, Choi S, Moon I, Cho K, Chai J, Kim C. Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs [Resumen]. *J Clin Periodontol*. 2003;30(5):443-453
17. Moreau J, Xu H. Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate-chitosan composite scaffold. *Biomaterials*. 2009;30(14):2675-2682
18. Larena A, Cáceres A, De la Piedra C, Montero M, Vicario C, Fuentes A, Ibarzábal A, Bernabeu E, Ribelles P. Preparación de biomateriales basados en quitosano y estudios como portadores de osteoblastos en cultivo. *Patología del Aparato Locomotor de la Fundación Mapfre Medicina*. 2005;3(1):55-63
19. Gaona, M. Recubrimientos biocompatibles obtenidos por Proyección Térmica y estudio in vitro de la función osteoblástica. [Tesis]. Universitat de Barcelona. Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metalúrgica; 2007. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/1077>.
20. Saulacic, N., Gándara, P., Somoza, M y García, A (2004). Distracción osteogénica del reborde alveolar: revisión de la literatura. *Med Oral*. 2004; 9:321-7.
21. Gómez, D (2000). Normas oficiales venezolanas del programa nacional de salud oral. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/uvs/saludbucal/normasvenez.pdf>

22. Coelho, M., Cintra, L., Rocha, A y Dos Santos, D. Problemas de funcionalidad. Aumento quirúrgico del reborde mandibular: estabilidad y función. *Acta Odontológica venezolana*. 2007; 45(2).
23. Oporto, G., Fuentes, R., Héctor, Á y Borie, E. Recuperación de la Morfología y Fisiología Maxilo-Mandibular Biomateriales en Regeneración Ósea. *Internacional Journal of Morphology*. 2008; 26(4).
24. Nyman S, Lang N, Buser D. Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: a report of two cases. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990; 5(1): 9-14.
25. Jovanovic S, Schenk R, Orsini M, Kenney E. Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10(1): 23-31.
26. Shenk R, Buser D, Hardwick W, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994; 9(1): 13-29.
27. Dahlin C, Lekholm U, Linde A. Membrane-induced bone augmentation at titanium implants. A report of ten fixtures followed from 1 to 3 years after loading. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1991; 11(4): 273-81.
28. Becker W, Becker B, Handlesman M, Celletti R, Ochsenein C, Hardwick R, et al. Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material: a pilot study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990; 10(2): 93-101.
29. Jovanovic S, Spiekermann H, Richter E. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscenced defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992; 7(2): 233-45.
30. Doria A, Mancado J. Patologías del sistema estomatognático. [en línea] *Revista Electrónica de PortalesMedicos.com*. 2008. Disponible en: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/1087/1/Patologias-del-sistema-estomatognatico.html>.
31. Velazco, G., Ortiz, R., González, A. Nuevas terapéuticas para regeneración ósea a base de hidroxiapatita y quitosano. *Acta Microscópica*. 2011; 20 (Supp. A): 1-4.
Disponible en:

[http://actamicroscopica.ivic.gob.ve/V20_1_2011/CONVEMI%202010%20\(Supp.%20A\)/index.html](http://actamicroscopica.ivic.gob.ve/V20_1_2011/CONVEMI%202010%20(Supp.%20A)/index.html)

32. Kawakami T, Antoh M, Hasegawa H, Yamagishi T, Ito M, Eda S. Experimental study on osteoconductive properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite self-hardening paste. *Biomaterials* 1992; 13:759–63.
33. Fwu-Long M, Shin-Shing S, Yu-Bey W, Sung-Tao L, Jen-Yeu S, Rong-Nan H. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing [resumen]. *Biomaterials*. 2001;22(2):165-73
34. Shin S, Park H, Kim K, Lee M, Choi Y, Park Y, et al. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration [resumen]. *J Periodontol*. 2005;76(10):1778-84
35. Chang –An G, Xue Guang L, Jian Zhon H, Chun J, Xue- Jun W, Zhen Rong C. Novel gene Modified-Tissue engineering of cartilage using Stable transforming growth factor B1 transfected Mesenchymal stem cells grown on Chitosan Scaffolds. *Journal of Bioscience and bioengineering*. 2007;103(6):547-56.
36. Suphasirroj W, Yotnuengnit P, Surarit R, Pichyangkura R. The fundamental parameters of chitosan in polymer scaffolds affecting osteoblasts (MC3T3-E1) [resumen]. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008;1(20):209-320
37. Park S, Kim S, Lim S, Ong J. Osteogenic activity of the mixture of chitosan and particulate dentin. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(3):618-23
38. Miranda S, Silva G, Hell R, Martins M, Alves J, Goes A. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction [resumen]. *Archives of Oral Biology*. 2011;56(1):1-15
39. Araujo, J, Negrón, E. Estudio comparativo de la eficiencia del xerogel y liposoma a base de quitosano para el tratamiento de la osteítis alveolar en ratas wistar. [Tesis]. Facultad de Odontología-Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela; 2012.
40. Fernández I, Alobera M, del Canto M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [en línea]. 2006; [consulta el 12 noviembre de 2011]; 11(1): 47-51. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/medicorpa/v11n1/11.pdf>.

41. Compston J. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001; 81(1): 419-47
42. Martínez B. Tumores óseos y lesiones fibro-óseas. [en línea]Chile: Martínez, B. S/F. Disponible en: <http://patoral.umayor.cl/tumolef/tumolef.html>.
43. Raspall G. Cirugía oral e implantología. 2ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A; 2007.
44. Boyne P. Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. *J Dent Res.* 1964; 43: 827.
45. Nyman S, Lindhe J, Karring T. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982; 9(4): 290-6.
46. Hammerle C, Karring T. Guided bone regeneration at oral implants sites. *Periodontology* 2000. 1998; 17: 151-75.
47. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988 May; 81(5): 672-6.
48. Goulet J, Senunas L, DeSilva G, Greenfield M. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin. Orthop Relat Res.*1997; 339: 76-81.
49. Schwartz Z, Weesner T, Van Dijk S, Cochran D, Mellonig I, Lohmann C, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol.* 2000; 71(8): 1258-69
50. Plasencia J, Cuesta M, Fernández-Alba J, Calderón J. Regeneración ósea guiada en implantología. En: Navarro C, García F, Ochandiano S. Cirugía oral. Madrid: Arán Ediciones; 2008: 207-24
51. Roach H. Bone anatomy and cell biology. 2000. Disponible en: http://www.ectsoc.org/reviews/011_roac.htm
52. Young M. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72(1): 2-4.
53. Weather P, Burkitt H, Daniels V. Functional histology. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1990: p. 248-52.
54. Canalis E, Economides A, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003; 24(2): 218-35.

55. Canfield A, Doherty M, Ashton B. Osteogenic potential of vascular pericytes. En: Davies J. Bone Engineering. Toronto: Em Squared Inc; 2000: p. 143-51.
56. Vanden L. Rigenerazione ossea guidata con membrane riassorbibili. Dent Cadmos. 2000; (4): 37-55.
57. Davies J, Hosseini M. Histodinamics of endosseous wound healing. En: Davies JE. Bone Engineering. Toronto: Em Squared Inc; 2000: p. 1-14.
58. Contreras M, Lleras M. Uso de la clorhexidina al 0,12% como método preventivo de la osteítis alveolar en pacientes con extracción indicada del tercer molar inferior incluido [tesis de pregrado]. Mérida: Universidad de Los Andes, Facultad de Odontología; 2005
59. Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. J Clin Periodontol. 2003; 30(9): 809-18.
60. Ohnishi H, Fujii N, Futami T, Taguchi N, Kusakari H, Maeda T. A histochemical investigation of the bone formation process by guided bone regeneration in rat jaws. Effect of PTFE membrane application periods on newly formed bone. J Periodontol. 2000; 71(3): 341-52.
61. Fernández I., Alobera M, Canto M, Blanco J. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(2): 151-157.
62. Sfeir C, Ho L, Doll B, Azari K, Hollinger J. Fracture Repair. En: Lieberman J, Friedlaender G. Bone regeneration and repair. Biology and clinical applications, Totowa: Humana Press; 2005: p. 21-44.
63. Dinatale E, Guercio E. Regeneracion ósea guiada (GBR). Revisión de la literatura. Acta Odontol Venez. 2008; 46(4): 554-61.
64. Braddock M, Houston P, Campbell K, Ashcroft P. Born again bone: tissue engineering for bone repair. News Physiol Sci. 2001; 16: 208-13.
65. Kim B, Baez C, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. World J. Urol. 2000; 18(1): 2-9.
66. Adachi T, Osako Y, Tanaka M, Hojo M, Hollister S. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. Biomaterials. 2006; 27(21): 3964-72.

67. Tonetti M, Pini-Prato G, Cortellini P. Effects of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in intrabony defects. A preliminary retrospective study. *J. Clin. Periodontol.* 1995; 22(3): 229-34.
68. Tonetti M, Pini-Prato G, Cortellini P. Periodontal regeneration of human intrabony defects. IV. Determinants of healing response. *J. Periodontol.* 1993; 64(10): 934-40.
69. Ardila C, Martín C. Regeneración Tisular Guiada: bases biológicas y clínicas. *Rev Fed Odontol Colomb.* 2003; 205: 26-37.
70. Galindo P, Sánchez E, Ávila G. Protocolo en sustitutos óseos. Protocolos y guías de práctica clínica en cirugía bucal. [en línea] Sociedad Española de Cirugía Bucal. (SECIB).2005. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/59299207/PROTOCOLOS-Y-GUIAS-DE-PRACTICA-CLINICA-EN-CIRUGIA-BUCAL-SECIB-2005>
71. Leghissa G, Boticelli A, Zaffe D. GBR in chirurgia impiantare immediata post-estrattiva. *Dent Cadmos.* 2000; 3: 37-44.
72. Salama R, Burwell R, Dickson I. Recombined grafts of bone and marrow. The beneficial effect upon osteogenesis of impregnating xenograft (heterograft) bone with autologous red marrow. *J Bone Joint Surg.* 1973; 55(2): 402-17.
73. Alberts, V. Biología molecular de la célula. 4 ed. Barcelona: Omega; 2004.
74. Expósito R. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2010
75. Hernández I. La Quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones. *Cultivos Tropicales.* 2004; 25(3):97-110.[en línea]Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=193217916014>
76. Velazco G, González A, Ortiz R. Apósitos de quitosano para el tratamiento de pie diabético. *Avances en Biomedicina.* 2012;1(1):38-41
77. Escobar D, Urrea C, Gutiérrez M, Zapata P. Producción de matrices de quitosano extraído de crustáceos. *Ingeniería Biomédica.* 2011;5(9):20-25
78. Beaney, P., Lizardi, J., Healy. M. (2005). Comparison of Chitins Produced by Chemical and Bioprocessing Methods. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80(2):145- 150.

79. Muzzarelli RAA, Stanic V, Ramos V. Enzymatic depolymerization of chitins and chitosans. *Methods in Biotechnol.* 2000; 10:197 -211.
80. Nishikawa H., Ueno A., Nishikawa S., Kido J., Oishi M., Inoue H. Biomaterial in endodontic. *J. Endod.* 2000; 2(6):169-75.
81. Goicoolea, F. Métodos de aislamiento y caracterización de las propiedades físicoquímicas. Taller "Química de Quitina y Quitosanos y su Aplicación en Control Ambiental". Bahía Blanca, Argentina. 2001:70.
82. Tsaih, M., Chen, R. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003; 8(8): 2917-23.
83. J. Gacén e I. Gacén. Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín Intexter.* 1996; 110: 67-71. [en línea] Disponible en: <http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/6421/1/Article06a.pdf>
84. Skaugrud O. Chitosan – New biopolymer for cosmetics and drugs. *Drug Cosmetic Ind.* 1991; 148: 24-29. Hasta aquí llegué con la corrección y el texto también
85. Katime I. *Química Física Macromolecular.* 2ª ed. Bilbao: Editorial de la Universidad del País Vasco; 1994
86. Suárez D, García C, Velazco G, Ortíz R, González A. Biogel de quitosano a partir de la desacetilación termoalcalina de conchas de camarón propuesta para el tratamiento de la estomatitis Subprotésica. *Rev Odontol Los Andes.* 2010;4(2):5-1
87. Hirano S, Noishiki Y, Kinugawa J, Highasijima H y Hayashi T. *Advances in Biomedical Polymers.* Gebelein C. G. (editor). New York: Plenum Press; 1997: 285
88. Mi F, Shyu S, Kuan C, Lee S, Lu K y Jang S. Chitosan–Polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis of polymer. *J Appl Polym Sci* 1999; 74(7): 1868-1879.
89. Amici, E. *Sintesi di Reticolati Polimerici. Processi convenzionali e a templat.* [Tesis]. Dipartimento di Chimica, Università “La Sapienza”. Roma- Italia; 1995.

90. Abram, A. Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica; 2004.
91. Berger J, Reist M, Mayer J, Felt O, Peppas N, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 57(1):19-34.
92. Gonçalves V, Laranjiera M, Fávere V. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros.* [online]. 2005; 15 (1): 6-12. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282005000100005&lng=en&tlng=en
93. Errington N, Harding SE, Varum KM, Illum L. Hydrodynamic characterisation of chitosans varying in molecular weight and degree of acetylation. *Int J Biol Macromol.* 1993; 15: 113-17.
94. Skaugrud O. Chitosan – New biopolymer for cosmetics and drugs. *Drug Cosmetic Ind.* 1991; 148: 24-29.
95. Champe, P; Harvey, R y Ferrier, D. *Biochemistry.* Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore; 2004. ISBN 0-7817-2265-9.
96. Kjellen L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991; 60: 443-75.
97. Bandtlow C, Zimmermann D. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev.* 2000; 80 (4): 1267-90.
98. Peplow P. Glycosaminoglycan: a candidate to stimulate the repair of chronic wounds. *Thromb Haemost.* 2005; 94: 4-16.
99. Kojima K, Okamoto Y, Miyatake K, Fujise H, Shigemasa Y, Minimani S. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. *J Vet Med Sci.* 2004; 66(12):1595-98.
100. Schatz C, Lucas J, Viton C, Domard A, Pichot C, Delair R. Formation and properties of positively charged colloid based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir.* 2004; 20(18):766-778.
101. Abarrategi A. Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhbmp-2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo [Tesis]. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, 2008

102. Mulder M. Basic Principles of Membrane Technology. 2nd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 2004.
103. Madrigal S, Seyler D, Manconi M, Mura S, Vila A, Molina F. An approach to rheological and electrokinetic behaviour of lipidic vesicles covered with chitosan biopolymer. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects*.2008; 323(1-3):149-54
104. Llabot J, Palma S, Allemandi D. Nanopartículas poliméricas sólidas. *Nuestra Farmacia*. 2008; 53: 40-47
105. Ramos G, Ramírez S, Esquivel M , Loría A, Vega J, Sibaja M, Madrigal S. Interacciones liposomas-biopolímeros. *Rev. Iberoam. Polím*. 2010; 1(7):593-606.
106. Araneda C y Valenzuela F. Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. *Revista Ciencia Ahora*. 2009; 22(11): 9-19.
107. Fuchs M, Turchiuli C, Bohin M, Cuvelier M, Ordonnaud C, Peyrat M et al. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*. 2006; 75(1): 27-35.
108. Parra R. Microencapsulación de Alimentos. *Rev Fac Nal Agr Medellín*. 2010; 63(2): 5669-5684.
109. Porras G, Vila A, Molina F, Sibaja M, Madrigal S. Vesículas liposomales estabilizadas con quitosano: estudio reológico. *Rev Iberoam Polim*. 2008; 9(6): 538-548.
110. Madrigal S, Porras G, Sibaja M, Vega J, Vila A, Molina F. Vesículas liposomales estabilizadas con quitosano: estudio electrocinético. *Rev Iberoam Polim*. 2010;11(1): 46-57
111. Hua L, Hong L, Wenjun C, Yuan Y, Minying Z, Changren Z. Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials *Acta Biomaterialia*. 2006; 2(9): 557–565.
112. Ting G, Jianning Z, Jianbin C, Zhi D, Hao H, Jiangning C, Junfeng Z. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-b1 for chondrocytes proliferation, *Biomaterials*. 2006; 2(7): 1095–1103

113. Higuera I, Toledo A, Goycoolea F. Tendencias en propiedad intelectual y orientación de mercado para la quitina y quitosano. En: Proceedings of the IV Iberoamerican Chitin Symposium. Brasil. Iberoamerican Chitin Society. 2007.
114. Wang J, Lou B. Pathohistological observation and biochemical analysis of burn wound healing with chimeherb artificial skin. *J Ocean Univ Qingdao*. 1989; 19: 19-23
115. Schatz C, Lucas J, Viton C, Domard A, Pichot C, Delair R. Formation and properties of positively charged colloid based on polyelectrolyte complexes of biopolymers. *Langmuir*. 2004; 20(18):766-778.
116. Mori T, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T, Fujinaga T. 2005. Mechanism of macrophage activation by chitin derivates. *J Vet Med Sci*. 67(1):51-56.
117. Senel S, McClure S. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56: 1467–1480
118. Rao S, Sharma C. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*. 1997; 34(1):21-8.
119. Shen E, Chou T, Gau C, Tu H, Chen Y. Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible bio-material for platelet-rich plasma preparation. *Clinical Oral Implants Research*. 2006; 17(5): 572-578.
120. Marguerite R. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006;31(7):603-632
121. Sugano M, Watanabe S, Kishi A, Izume M, Ohtakara A. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats [resumen]. *Lipids*. 1988;23(3):187-191
122. Li D, Fan S, Zhu X, Tan Y, Xiao W, Lu J y cols. Controllable release of salmon-calcitonin in injectable calcium phosphate cement modified by chitosan oligosaccharide and collagen polypeptide [resumen]. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;11(18):2225-2231
123. Ormrod D, Holmes C, Miller T. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis [resumen]. *Atherosclerosis*. 1998;138(2):329-334

124. Jing S, Li L, Ji D, Takiguchi Y, Yamaguchi T. Effect of chitosan on renal functions in patients with chronic renal failure [resumen]. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49(7):721-723
125. Hoekstra A, Struszczyk H, Kivekäs O. Percutaneous microcrystalline chitosan application for sealing arterial puncture sites [resumen]. *Biomaterials.* 1998;19(16):1467-1471
126. Espinoza E. Propiedades Físicas y Biológicas de dos tipos de esponjas de Quitosano para su aplicación como biomaterial [tesis]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología; 2007.
127. Lemus J, Martínez L, Navarro M, Posadas A. Obtención y uso de Quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón [boletín electrónico]. Guatemala: Universidad Rafael Landívar. [Citado 11 de Julio de 2010]. Disponible en http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_07_QUI01.pdf
128. Balicka A, Wojtasz A, Pilarczyk B, Ramisz A, Laurans L. Antibacterial and antifungal activity of chitosan. *ISAH.* 2005;2(1):406
129. Ono K, Saito Y, Yura H, Ishikawa K, Kurita A, Akaike T, Ishihara M. Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive [resumen]. *J Biomed Mater Res.* 2000;49(2):289-295
130. Knapczyk J. Preclinical study of antimycotic chitosan hydrogel efficacy. *Chitin World.* 1994;5(3):512-519
131. Meshali M, el-Dien E, Omar S, Luzzi L. A new approach to encapsulating nonsteroidal anti-inflammatory drugs. IV. Effect of cellulose derivatives with different functional groups on the bioavailability and gastric ulcerogenic activity of acidic as well as basic nonsteroidal anti-inflammatory drugs [resumen]. *J Microencapsul.* 1989;6(3):355-360
132. Tarsi R, Muzzarelli R, Guzman C, Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans [resumen]. *J Dent Res.* 1997;76(42):665-672
133. Zhao H, Sun G, Miao D. Antibacterial Activity of dental alginate impression materials impregnated with chitosan [resumen]. *Progress in Biomedicine.* 2008;8(8):1462-1503

134. Bae K, Jun E, Lee S, Paik D, Kim J. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality [resumen]. *Clin Oral Invest*. 2006;10(2):102–107
135. Hiroshi S, Ken-Ichiro S, Takashi M, Yoshinori T. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. *Tokyo dent Coll*. 2003;44(1):9-16
136. Hayashi Y, Ohara N, Ganno T, Yamaguchi K, Ishizaki T, Nakamura T, Sato M. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria [resumen]. *Arch Oral Biol*. 2007;52(3):290-294
137. Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2001;22(16):2247-2255
138. Azcurra A, Barembaum S, Bojanich M. Efecto del Quitosano de alto peso molecular y del alginato de sodio, sobre la hidrofobicidad y adhesión de *Candida albicans* a células. *Med oral Patol oral Cir bucal*. 2006;11(2):120-125
139. Park Y, Yeon J, Ri H, Hwa K, Chul S, Shim K, y cols. Injectable polysaccharide microcapsules for prolonged release of minocycline for the treatment of periodontitis. *Biotechnology letters*. 2005;27(22):1761-1766
140. Portero A. Desarrollo de nuevos sistemas mucoadhesivos de Quitosano para la liberación específica de moléculas activas a través de las mucosas gástrica y bucal [tesis]. Santiago de Compostela, España: Universidad Santiago de Compostela; 2001
141. Lee D, Spångberg L, Bok Y, Lee C, Kum K. The sustaining effect of three polymers on the release of chlorhexidine from a controlled release drug device for root canal disinfection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(1):105-11
142. Zhao H, Wu B, Wu H, Su L, Pang J, Yang T, Liu Y. Protective immunity in rats by intranasal immunization with *Streptococcus mutans* glucan-binding protein D encapsulated into chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Biotechnol Lett*. 2006;28(16):1299–1304
143. Norowski P, Bumgardner J. Review Biomaterial and Antibiotic strategies for Peri-implantitis. *J Biomed Mater Res B*. 2009;88B(2):530-543

144. Decker E, Von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies [resumen]. *J Periodontal Res.* 2005;40(5):373-377
145. Petri F, Donegá J, Benassi A, Bocangel J. Preliminary study on chitosan modified glass ionomer restoratives [resumen]. *Dent Mater.* 2007;23(8):1004-1010
146. Zhao S. Preparation of Porous Chitosan Membranes for Pulp Capping. Conferencia IADR; 2005
147. Nie M, Bian Z, Wang R, Chen X, Fan M. The potential application of chitosan HTCMC as pulp-capping material. En: Conferencia IADR; 2005
148. Liu W, Tang Z, Wang W. Clinical study on chitosan in curing irreducible anterior disc displacement of temporomandibular joint. *West china journal of stomatology.* 2003;21(3):197-199
149. Hurtado, J (2000). Metodología de la Investigación Holística. Tercera edición. Editorial Fundación Sypal, Caracas, Venezuela pp 453-455, 523-529
150. Arias F. El proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica. 5ta ed. Caracas, Venezuela: Episteme; 2006
151. Peral Cagigal B., Redondo González L.M., Verrier Hernández A., Serrat Soto A., Torres Nieto M.Á., Vaquero Puerta C. Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac* [revista en la Internet]. 2008 Oct [citado 2012 Mayo 27]; 30(5): 313-323. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582008000500001&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4321/S1130-05582008000500001>.
152. Heiple KG, Chase SW, Herndon CH. A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J Bone Joint Surg Am.* 1963; 45:1593-616.
153. Boynuegri, D., Ozcan, G., Senel S., Uc, D., Uraz, A, Ogus, E., Cakilci, B y Karaduman, B. Clinical and radiographic evaluation of chitosan gel in periodontal intraosseus defects: A pilot study. *J. Biomed Mater Res A.* 2009 Jul; 90(1):461-6.

154. Venkatesan, J y Kim, S. Chitosan composites for bone tissue engineering- an overview. *Mar. Drugs*. 2010; 8: 2252-2266.
155. Danilchenko, S., Kalinkevich, O., Pogorelov, M., Kalinkevich, A., Sklyar, A., Kalinichenko, T., Ilyashenko, V., Starikov, V., Bumeyster, V., Sikora, V y Sukhodub, L. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Mar 15; 96(4):639-47. doi: 10.1002/jbm.a.33017. Epub 2011 Jan 25.
156. Rao G, Balasubramanian N, Prataban S, y William B. Clinical evaluation of chitin and chitosan in the management of fractures. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences*. January-February 2009, 5(1)1-3
157. Niu, X, Liu, X, Li X, Wang, J, Sha, Z y Feng Q. Repair of bone defect in femoral condyle using microencapsulated chitosan, nanohydroxyapatite/collagen and Poly (L-lactide)-based microsphere-scaffold delivery system. *Artif Organs*. 2011 Jul; 35(7).
158. Jiang T, Nukavarapu, S, Deng, M, Jabbarzadeh E, Kofron, M, Doty S, Abdel, W, y Laurencin C. Chitosan-poly(lactide-co-glycolide) microsphere-based scaffolds for bone tissue engineering; in vitro degradation and in vivo bone regeneration studies. *Acta Biomater* 2010 Sept; 6(9): 3457-70.
159. Kung, S, Devlin H, Fu E, Ho K, Liang S, Hsieh Y. The osteoinductive effect of chitosan-collagen composites around pure titanium implant surfaces in rats. *J. Periodont Res* 2011; 46:126-133.