



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

“ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA OSTEOSUSTITUCIÓN CON UN
BIOMATERIAL (QUITOSÁN) DURANTE LA REPARACIÓN ÓSEA EN UN
MODELO EN CONEJOS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTENISTA

P R E S E N T A N:

Minerva Pedro Ponce

Norma Rocío Caballero Ramírez

ASESOR: M. en C. ENRIQUE FLORES GASCA

COASESOR: DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

El uso de injertos óseos dentro de la cirugía ortopédica se introdujo a principios del siglo XX y a lo largo de los últimos años se han desarrollado diferentes formas de utilización y preservación (frescos, congelados, desmineralizados, liofilizados, etc). Se han utilizado diferentes técnicas de injertación (autogénica, alogénica y xenogénica) las cuales pretenden la integración de los injertos al hueso receptor, para promover la osteogénesis a través de la osteoinducción y/o osteoconducción.

El presente trabajo se realizó para evaluar la capacidad de osteointegración de un biomaterial (quitosán) durante la reparación ósea. Se utilizaron 9 conejos Nueva Zelanda, machos sanos, de 2.5-3.0 kg de peso, alojados en la UIM. Los cuales se dividieron de forma aleatoria en 3 grupos, para los tiempos de evaluación de 3, 4, y 5 semanas. Mismos que fueron sometidos a cirugía realizándoles osteotomías de 4 mm en ambas tibias, la derecha fue tratada con esponjas del mismo diámetro elaboradas con el biomaterial quitosán y la izquierda no recibió ningún tratamiento. A las laminillas obtenidas se les realizó tinción de rutina HE. Se evaluó principalmente la respuesta del tejido óseo al biomaterial y la reparación. En la evaluación clínica que se les realizó a todos los animales del experimento no se observaron cambios conductuales como depresión, agresividad, hiporexia, adipsia, se tomaron muestras prequirúrgicas y postquirúrgicas de cada conejo para la evaluación de laboratorio clínico, en las cuales se evaluó la cuenta leucocitaria donde se denotaba un aumento principalmente en eosinófilos. La morfología microscópica entre las controles fue similar, no presenta cambios patológicos aparentes y la reparación es consistente con una herida quirúrgica. En las semanas 3, 4 y 5 se observó en las osteotomías con esponja una respuesta inflamatoria progresiva, provocada por el quitosán, compatible con la reacción generada de un proceso inflamatorio de tipo supurativo y generación de celularidad tipo fibrocitos fibroblastos para cubrir la esponja. La reacción observada puede deberse a la composición proteica del quitosán y al pH bajo en que se producen este tipo de biomateriales. El quitosán no es recomendable implantarlo bajo estas características, finalmente no se integró.

CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	
I.1. Estructura del hueso.....	5
I.2. Reparación ó consolidación ósea.....	9
I.3. Biomateriales.....	11
I.4. Quitosán.....	17
II. OBJETIVOS	
II.1. Objetivo general.....	26
II.2. Objetivo particular.....	26
III. HIPÓTESIS	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
IV.1. Material biológico.....	27
IV.2. Obtención del biomaterial.....	28
IV.3. Preparación quirúrgica.....	30
IV.4. Técnica quirúrgica.....	30
IV.5. Evaluación clínica.....	31
IV.6. Evaluación de laboratorio.....	32
IV.7. Evaluación radiológica.....	32
IV.8. Evaluación histológica.....	33
V. RESULTADOS	
V.1. Evaluación clínica.....	34
V.2. Evaluación laboratorio.....	36
V.3. Evaluación radiológica.....	39
V.4. Evaluación histológica.....	46
VI. DISCUSIÓN	58
VII. CONCLUSIONES	65
VIII. BIBLIOGRAFÍA	66

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la quitina y quitosán.....	18
--	----

Índice de cuadros

Cuadro 1. Características de quitosán.....	28
Cuadro 2. Criterios de evaluación radiográfica de la respuesta perióstica.....	32
Cuadro 3. Criterios de evaluación radiográfica de la presencia de material radiopaco en el defecto.....	32

Índice de imágenes

Imagen 1. Conejo Nueva Zelanda alojado en la UIM.....	28
Imagen 2. Esponjas de quitosán.....	29
Imagen 3. Esponja de quitosán 45X barra de 1000 micras y 100X barra de 1000 micras...29	
Imagen 4. Esponja de quitosán 300X barra de 1000 micras y 450X barra de 1000 micras.29	
Imagen 5. Conejo rasurado y canalizado en el prequirúrgico.....	30
Imagen 6. Incisión quirúrgica y colocación del quitosán en la tibia derecha.....	31
Imagen 7. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 1 control, tomas cráneo-caudal y medio-lateral.....	41
Imagen 8. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 1 experimental, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	41
Imagen 9. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 2 control, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	42
Imagen 10. Evaluación radiográfica postquirúrgica, semana 2 experimental, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	42
Imagen 11. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 3 control, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	43
Imagen 12. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 3 experimental, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	43
Imagen 13. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 4 control, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	44
Imagen 14. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 4 experimental, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	44

Imagen 15. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 5 control, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	45
Imagen 16. Evaluación radiológica postquirúrgica, semana 5 experimental, toma cráneo-caudal y medio-lateral.....	45
Imagen 17. Tinción H-E 4X, semanas tres, cuatro y cinco.....	46
Imagen 18. Tinción H.E 10X. Corte de la esponja de quitosán.....	46
Imagen 19. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 3 semanas.....	47
Imagen 20. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 3 semanas, con eosinófilos.....	48
Imagen 21. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 4 semanas.....	49
Imagen 22. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 4 semanas con macrófagos.....	49
Imagen 23. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 4 semanas con macrófagos y eosinófilos.....	50
Imagen 24. Tinción H-E 100X. Tibia experimental a las 4 semanas con eosinófilos.....	51
Imagen 25. Tinción H-E 10X. Tibia experimental a las 5 semanas.....	52
Imagen 26. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 5 semanas, con eosinófilos y macrófagos.....	53
Imagen 27. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 5 semanas, interior del quitosán...	54
Imagen 28. Tinción H-E 40X. Tibia control a las 3 semanas.....	55
Imagen 29. Tinción H-E 40X. Tibia control a las 4 semanas.....	56
Imagen 30. H-E 40X. Tibia control a las 5 semanas.....	57

Índice de graficas

Grafica 1. Diámetro cráneo-caudal de la tibia experimental y control.....	34
Grafica 2. Diámetro medio-lateral de la tibia experimental y control.....	35
Gráfica 3. Valoración del hematocrito pre y post quirúrgicamente.....	36
Gráfica 4. Valoración de leucocitos pre y post quirúrgicamente.....	36
Gráfica 5. Valoración de linfocitos pre y post quirúrgicamente.....	37
Gráfica 6. Valoración de neutrófilos pre y post quirúrgicamente.....	37
Gráfica 7. Valoración de eosinófilos pre y post quirúrgicamente.....	38
Gráfica 8. Valoración de Fosfatasa alcalina sérica pre y post quirúrgicamente.....	38
Grafica 9. Valoración de la respuesta perióstica en las tibias control y experimentales.....	39
Grafica 10. Valoración de la presencia del material en las tibias control y experimentales.....	40

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Estructura del hueso

El hueso es un tejido de sostén altamente especializado y caracterizado por su rigidez y dureza. Sus funciones principales son: sostén mecánico, permite la locomoción, proporciona protección y actúa como reservorio metabólico de sales minerales. Durante la época embrionaria se forma por medio de dos procesos; la osteogénesis intramembranosa y la osteogénesis endocondral. La primera se lleva a cabo a partir de células de la membrana mesenquimatosa (periostio), mientras que en la endocondral crecen y son osificados los huesos largos. El hueso es un tipo de tejido conjuntivo formado por células y material intercelular calcificado: la matriz ósea. La característica que distingue el tejido óseo de otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz (Trigo 1998, Junqueira 2000, Ross 2004, Stevens 2006).

En los huesos largos la característica estructural macroscópica corresponde a dos tipos de hueso laminar, es decir, una compacta (cortical) y otra esponjosa (medular). La compacta forma las densas paredes de los tallos ó diáfisis, mientras que la esponjosa ocupa parte de la cavidad medular central y consiste en una red de finas láminas irregulares llamadas trabéculas ó cavidad medular, que aloja la medula ósea y un tejido hematopoyético. Las superficies articulares ó epífisis de los huesos largos están protegidas por una capa de cartílago hialino especializado llamado articular. El hueso está cubierto en una superficie externa, excepto en articulaciones sinoviales, con un periostio, que consiste en una capa de tejido conectivo denso fibroso y una capa celular interna que incluye células osteoprogenitoras (osteogénicas). La cavidad medular de un hueso está recubierta con un tejido conectivo delgado especializado, compuesto de una monocapa de células osteoprogenitoras y osteoblastos, denominado endostio (Gartner 2002, Fawcett 1999, Young 2004).

A lo largo del hueso cortical existe una red de conductos de Havers (Osteona), conectados a otros conductos transversales de Volkman. Estos contienen vasos sanguíneos y algunos nervios, los haces neurovasculares establecen interconexiones entre si y con el endostio y el periostio a través de los conductos que atraviesan las columnas formando ángulos rectos con los canales de Havers. Cada conducto está rodeado por capas concéntricas de hueso laminar, estas capas contienen anillos concéntricos de osteocitos,

situados en pequeñas lagunas y comunicados con los osteocitos de su propia capa y de las adyacentes a través de sus prolongaciones citoplasmáticas (Stevens 2006, Young 2004).

La matriz ósea tiene constituyentes orgánicos e inorgánicos; éstos últimos forman alrededor del 65% del peso seco del hueso y está compuesto sobre todo de calcio y fosforo, además del bicarbonato, citrato, magnesio, sodio y potasio. El calcio y fosforo se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, mientras que el fosfato de calcio se encuentra en forma amorfa, y están dispuestos en forma ordenada a lo largo de fibras de colágena tipo 1; se depositan en las regiones de intersticio de colágena pero también existen a lo largo de la región superpuesta. La superficie libre de los cristales esta rodeada de sustancia fundamental amorfa. La dureza y fuerza del hueso se deben a la conjunción de cristales de hidroxiapatita con colágena (Gartner 2002).

El componente orgánico de la matriz ósea, constituye alrededor del 35% del peso seco del hueso e incluye fibras que son casi exclusivamente de colágena tipo I, esta colágena esta enlazada a nivel transversal lo que impide que se extraiga con facilidad. En la matriz ósea se encuentran varias glucoproteínas que incluyen osteocalcina y osteopontina, que se unen a la hidroxiapatita. La vitamina D estimula la síntesis de estas proteínas (Gartner 2002).

Las células óseas incluyen osteoprogenitoras fusiformes y de aspecto indiferenciado, su núcleo alargado es pálido y su citoplasma ligeramente basófilo, estas son las precursoras inactivas de las principales células osteoformadoras del hueso, que se diferencian en osteoblasto, y tienen a su cargo la secreción de la matriz. Cuando estas células quedan rodeadas por matriz, se tornan inactivas y se conocen como osteocitos. Los espacios que ocupan los osteocitos se denominan lagunas. Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas derivadas de precursores de medula ósea fusionados, tienen como función la resorción y remodelación del hueso. Las células osteoprogenitoras están localizadas en la capa celular interna del periostio, recubriendo canales Haversianos y en el endostio, estas derivan del mesénquima embrionario, pueden dividirse por mitosis. Estas células son más activas durante el periodo de crecimiento óseo intenso, pueden ser reactivas en la vida adulta y hacer que proliferen y se diferencian a osteoblastos necesarios para la reparación de fracturas (Gartner 2002, Fawcett 1999).

Los *osteoblastos*, derivados de células osteoprogenitoras, tienen a su cargo la síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea, incluyendo colágena tipo I, proteoglicanos y glucoproteínas, así como algunos de sus componentes menores (osteocalcina, osteonectina y osteopontina). Se localizan dispuestos en capas sobre la superficie del hueso y extienden prolongaciones cortas que hacen contacto con otros osteoblastos, así como prolongaciones largas entran en contacto con la de los osteocitos. A medida de que los osteoblastos eliminan por exocitosis sus productos secretorios, cada célula se rodea así misma con la matriz ósea que acaba de elaborar; cuando esto ocurre, la célula encerrada se denomina osteocito y el espacio que ocupa se conoce como laguna. La mayor parte de la matriz ósea se calcifica, pero los osteoblastos al igual que los osteocitos siempre están separados de la sustancia calcificada por una capa no calcificada delgada, denominada osteoide (matriz ósea no calcificada). Las membranas celulares del osteoblasto son ricas en fosfatasa alcalina durante la formación activa de hueso, estas células secretan concentraciones altas de esta enzima, que elevan valores sanguíneos de esta en consecuencia. Los osteoblastos tiene varios factores en sus membranas celulares, de los cuales los más importantes son integrinas y receptores de hormona paratiroidea, cuando esta hormona se une a estos receptores estimula a los osteoblastos para que secreten ligando de osteoprogerina (LOPG), un factor que induce la diferenciación de preosteoclastos en osteoclastos y también factor estimulante del osteoclasto, para que resorban hueso. Además los osteoblastos tienen receptores en la superficie celular para algunas hormonas, vitaminas y citosinas que influyen en su actividad (Gartner 2002, Fawcett 1999).

Los *osteocitos* son células maduras derivadas de osteoblastos, que se alojan en lagunas dentro de la matriz ósea calcificada y se reconocen entre ellos por espacios estrechos parecidos a un túnel (canalículo), que alojan las prolongaciones citoplasmáticas del osteocito, estos se ajustan a la forma de las lagunas. Los canalículos también contienen líquido extracelular que llevan nutrientes y metabolitos para nutrirlos. En el interior de los canalículos las prolongaciones de los osteocitos establecen contactos con osteocitos vecinos mediante uniones comunicantes que permiten el flujo de iones y pequeñas moléculas (Junqueira 2000, Gartner 2002).

Los *osteoclastos* son células fagocitarias, móviles, gigantes, ampliamente ramificadas y multinucleadas que se originan de la célula progenitora de granulocitos y macrófagos

(GM-CFU) este precursor del osteoclasto se conforma en la medula ósea. Una vez en el tejido óseo pasan a formar osteoclastos plurinucleados. Éstos se encargan de resorber hueso; después de hacerlo estas células probablemente sufren apoptosis. Ellos ocupan lagunas de Howship que se producen por la degradación del hueso por enzimas segregadas por los osteoclastos en el hueso subyacente. La parte del osteoclasto que entra en contacto con el hueso se caracteriza por poseer finas microvellosidades que forman un borde ondulado, en este, las células secretan varios ácidos orgánicos que disuelven el componente mineral, mientras que las enzimas proteolíticas ribosómicas destruyen la matriz orgánica. Los osteoclastos secretan hidrolasas lisosómicas y metalproteinasas, como colagenasas y gelatinasas, hacia el compartimiento subosteoclastico para degradar los componentes orgánicos de la matriz ósea descalcificada, los osteoclastos segregan iones H^+ en la laguna subyacente que acidifica su contenido para disolver el mineral óseo (Junqueira 2000, Gartner 2002, Young 2004, Fawcett 1999).

I.2. Reparación ó consolidación ósea

El tejido óseo es rígido y resistente, sin embargo, puede sufrir fracturas y fisuras causadas por accidentes y enfermedades. La consolidación ósea está dada por una bien definida secuencia de cambios histomorfológicos que ocurren alrededor del sitio de fractura. El hueso es un tejido de alta capacidad de renovación, la formación ósea puede ocurrir de dos formas, la primera es directamente a través de las células mesenquimáticas, como el caso de los huesos del cráneo, lo que se conoce como osificación intramembranosa, la segunda por la intervención de un estadio cartilaginosa que procede a la formación ósea, este es el caso de la mayoría de los huesos, este proceso es conocido como osificación endocondral (Almazán 1996, Domínguez 2006).

La formación ósea intramembranosa se produce en el interior de membranas de tejido mesenquimatoso primitivo condensado. Las células mesenquimales se diferencian en osteoblastos, que comienzan a sintetizar y secretar osteoide en centros de osificación múltiples; inmediatamente se inicia la mineralización del osteoide. La osificación endocondral es un método de formación de hueso que permite a este soportar las tensiones funcionales durante su crecimiento y que se observa bien durante el desarrollo de los huesos largos (Young 2004).

Una fractura ocurre cuando se sobrepasan los límites de resistencia del hueso, lo que inicia una secuencia de respuestas tisulares sistémicas y específicas, las cuales concluyen con la competencia biomecánica del tejido finalmente formado. La reparación de las fracturas ocurre a través de una serie de transiciones celulares: fibrogenésis, condrogenésis, osteogenésis y mineralización, mediante una secuencia que incluye una etapa de reacción inflamatoria del día 0 al 5 postfractura, formación del callo del día 4 al 40, remodelación del día 23 al 50 (Almazán 1996).

La capacidad de regeneración del hueso es un fenómeno importante que facilita la reparación cuando ocurre una fractura ósea, implica una cascada de respuestas tisulares que están diseñadas para efectuar la eliminación de tejido muerto, restablecimiento de la vascularidad ósea y producir una matriz extracelular apropiada para el establecimiento de un tejido esquelético. Se han considerado dos tipos de reparación, la denominada reparación ósea primaria y la secundaria; en la primera el crecimiento directo de los sistemas Haversianos a través de la fractura permite la reparación o unión ósea, esta

reparación se caracteriza por reducir y fijar la fractura mediante un método rígido, la reparación ósea secundaria se presenta en fracturas con áreas de contacto óseo intermitentes, seguida de la unión indirecta del hueso, se pueden determinar una serie de etapas durante esta reparación (Almazán 1996, Domínguez 2006).

La primera etapa corresponde; a la **hemorragia** se debe a la ruptura de los conductos de Havers y Volkmann, así como algunos vasos de los tejidos blandos periféricos a la fractura que genera; el **coagulo**, que es la siguiente etapa en la cual la sangre se coagula y atrapa elementos celulares (eritrocitos, plaquetas y leucocitos), los cuales participan en la cascada de eventos de la inflamación, como el desbridamiento, la escarificación y la posterior reparación celular; la **inflamación y edema**, se presenta asociada al traumatismo, la destrucción celular, la hipoxia del tejido que quedó sin vascularidad, la activación de leucocitos atrapados en el coagulo y la consecuente liberación de citosinas; la **proliferación y diferenciación** de células pluripotenciales con capacidad de diferenciar a fibroblastos que produzcan la colágena que sirve de armazón, al tiempo que penetran vasos sanguíneos de nueva formación y ocurre la diferenciación de células de tipo osteoblasto; **la formación de cartílago y hueso**. Las células mesenquiales diferenciadas en osteoblasto tienen la capacidad de producir colágena de tipo IV, creándose así el llamado callo óseo blando, el cual se mineraliza posteriormente creándose nuevos osteocitos y la reparación de la fractura; finalmente la **remodelación**, que es el proceso mediante el cual tanto osteoblastos como osteoclastos permiten ordenar y restablecer la forma anatómica en el sitio de la fractura pero sin recuperarse la estructura haversiana (Flores 2003).

I.3. Biomateriales

Actualmente los tratamientos para fracturas se basan en la regeneración ósea utilizando injertos que promuevan mecanismos de osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción para reemplazar osteocitos y matriz extracelular perdida hasta formar hueso nuevo. La necesidad de restaurar ó substituir tejido óseo, es un problema que enfrenta la medicina desde su surgimiento y que permanece hasta nuestros días. La ciencia se ha planteado la tarea de encontrar ó crear materiales naturales ó sintéticos, con propiedades para substituir al tejido vivo, lo que ha dado origen a la ciencia de los biomateriales. La búsqueda y el desarrollo de nuevos materiales capaces de substituir al hueso es una de las prioridades en el tratamiento de defectos óseos de diferente etiología (Albarova 2002, Ciénega 1998, Domínguez 2006).

El uso de injertos óseos dentro de la cirugía ortopédica se introdujo a principios del siglo XX y a lo largo de los últimos años se han desarrollado diferentes formas de utilización y preservación (frescos, congelados, desmineralizados, liofilizados, etc). Se han utilizado diferentes técnicas de injertación (autogénica, alogénica y xenogénica), las cuales pretenden la integración de los injertos al hueso receptor, para promover la osteogénesis a través de la osteoinducción y/o osteoconducción (Flores 2003).

Los tratamientos aplicados a las fracturas son placas y tornillos que fijan el hueso hasta soldar, en su mayoría elaborados de materiales ajenos a la composición del hueso, esto es porque cada día se elaboran materiales nuevos para obtener mejores resultados en el estudio del proceso de regeneración que consiste en reemplazar con células de la misma estirpe el tejido desaparecido mediante mecanismos de osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción, para realizar una serie de procesos de angiogénesis, migración, proliferación de células indiferenciadas, diferenciación de osteoblastos, producción de osteoides, mineralización y remodelación. El sustituto óseo ideal debería ser osteogénico, biocompatible, bioabsorbible, capaz de proporcionar un soporte estructural y de vehiculizar otras sustancias, fácilmente utilizable en clínica y con una adecuada proporción de costo-beneficio. En la práctica, sería deseable que en determinadas aplicaciones una ó varias de dichas características predominasen sobre otras en función de la necesidad del caso que se va a tratar. Los sustitutos óseos pueden emplearse en el relleno de pequeñas cavidades, ó

mezclados con el autoinjerto óseo con la finalidad de incrementar el volumen del mismo (Domínguez 2006, Albarova 2002).

Los biomateriales son usados en dispositivos médicos, sobre todo en aquellos que son temporales ó permanentemente implantados en el cuerpo. El término biomaterial fue definido en la conferencia del Instituto Nacional de Desarrollo en Salud en 1982, como: “ cualquier sustancia (no medicamentosa) ó combinación de sustancias, de origen sintético ó natural, que pueda ser usada por un periodo de tiempo, completa ó parcialmente como parte de un sistema; que trate, aumente ó sustituya cualquier tejido, órgano ó función del cuerpo”. Paralelo a su disponibilidad, un sustituto ó un implante óseo ideal necesita ser obtenido en la cantidad y forma necesaria para depositarse en el defecto óseo. Los materiales poseen propiedades osteoconductoras que sirven de esqueleto ó armazón para la llegada de células, donde se van a hospedar, llevando a la proliferación celular con actividad osteoblástica. La aplicación de materiales en el campo quirúrgico, odontológico y ortopédico, se enfoca en generar propiedades de un material con reproductibilidad del hueso ideal, siendo la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la habilidad de iniciar la osteogénesis, su composición y sus propiedades mecánicas similares a aquellas del hueso. El biomaterial además de cumplir una función mecánica específica una vez implantado, necesita tener propiedades de compatibilidad con el tejido vivo. Estos materiales generalmente se dividen en cuatro grupos: metales, cerámica, polímeros y compuestos, teniendo en cuenta que de acuerdo a la respuesta biológica inducida se pueden clasificar como: biotolerables, bioinertes, bioactivos y biodegradables. El material que induzca una respuesta biológica específica en el tejido vivo, formando una unión entre el tejido y el material implantado (osteointegración), sin la intervención de una capa de tejido fibroso se da por la bioactividad. A pesar de que existen numerosos sustitutos óseos sintéticos que se utilizan, como metales, cerámicas y polímeros se han desarrollado para promover la regeneración ósea desde hace varias décadas, existe una falta de confianza en sus actuaciones biológicas, particularmente en relación a largo plazo, en la seguridad y la eficacia *in vivo*. Recientemente, la investigación de biomateriales funcionales se ha dirigido hacia el desarrollo de los andamios y de la mejora de nuevos sistemas de suministro de medicamentos para la medicina regenerativa (Pavan 2010, Hua 2008, Chunmeng 2006).

La cirugía ortopédica requiere incorporar técnicas con nuevos materiales que permitan realizar una cirugía cada vez más funcional. Ciertas proteínas y factores de crecimiento (FC) como; el factor β transformante de crecimiento de proteínas óseas morfogenéticas, los factores de crecimiento de fibroblastos, los de crecimiento tipo insulina y los derivados de plaquetas, son los tipos más usuales. Estas sustancias almacenadas en las plaquetas juegan un importante papel en los procesos de reparación. Los factores de crecimiento derivados de las plaquetas y los diferentes geles plaquetarios han ganado gran popularidad en los últimos años (Bonete 2009, Álvarez 2002).

La incorporación del injerto óseo es un proceso secuencial que comienza con la inflamación y atraviesa por diferentes estadios de revascularización, osteogénesis y remodelación hasta conseguir una estructura mecánica adecuada sin olvidar que el requisito fundamental en un injerto es su capacidad de formar ó ser substituido por hueso sin ser rechazado por el receptor. Se consideran tres mecanismos en la incorporación de los injertos óseos: la osteoinducción, proceso que induce a la formación de hueso localmente, reclutando las células necesarias; la osteoconducción, proceso habitual de reconstrucción ósea que consiste en aportar un soporte para el depósito óseo, como una estructura que sirva para el crecimiento óseo y que será progresivamente remplazada por hueso y por último el propio injerto, el cual actúa como fuente de formación de células óseas. También se puede hablar de la osteosustitución; cuando un material inerte actúa como una estructura que es substituida por hueso. Todas las técnicas de implantes óseos se basan en utilizar en mayor ó menor grado una ó varias de estas funciones (Álvarez 2002).

Un defecto óseo es siempre un problema difícil para los cirujanos. Hay muchos medios para reparar defectos óseos como; injerto óseo vascularizado, injerto de hueso no vascularizado, aloinjerto, y así sucesivamente. Sin embargo, cada uno tiene sus propias limitaciones (Hua 2008).

La ingeniería de tejidos usa los principios y métodos de la ingeniería, la biología y la bioquímica para la comprensión de la estructura y la función de los tejidos normales y patológicos de los mamíferos y el consecuente desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función (Velasco 2010).

La medicina regenerativa, uno de los campos más activos de la ciencia presente y futura, apunta a la restauración ó sustitución de órganos perdidos ó dañados, en

combinación con andamios de apoyo y biomoléculas. Recientemente la investigación de biomateriales funcionales se ha dirigido hacia el desarrollo de estos y mejores sistemas de administración de fármacos para la medicina regenerativa. Se están haciendo esfuerzos hacia los tejidos artificiales, incluyendo el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos y piel. La química de materiales y la tecnología bioquímica han pasado a la utilización de biomateriales que pueden reparar o reemplazar tejidos. La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que aplica los principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructurales y funcionales en el tejido normal y patológico y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener, o mejorar la función (Chunmeng 2006, Muzzarelli 2011).

El andamio es un componente muy importante para la ingeniería de tejidos. Una serie de requisitos han sido identificados como cruciales para la producción de andamios de la ingeniería de tejidos: 1) el andamio debe poseer poros interconectados a una escala adecuada para favorecer la integración de los tejidos y la vascularización, 2) ser de un material con biodegradabilidad controlada ó bioabsorbible para que el tejido termine por reemplazarlo, 3) tener químicamente una superficie adecuada para favorecer la unión, la diferenciación y la proliferación celular, 4) poseer propiedades mecánicas adecuadas para que coincida con el lugar previsto de implantación y manejo, 5) no debe inducir una respuesta adversa y, 6) fabricarse fácilmente en una variedad de formas y tamaños (Chunmeng 2006).

Los andamios son una estructura tridimensional que ofrece apoyo físico y actúa como un sustrato que regulan el crecimiento celular, la adhesión y diferenciación, desempeñan un papel esencial en el apoyo a la regeneración ósea en la ingeniería de tejido, estos andamios pueden funcionar como sustancia bioactiva la cual influye en el comportamiento y crecimiento celular, además debe poseer un sistema interconectado y porosidad (Arpornmaeklong 2006, Muzzarelli 2011).

Un tamaño de poro grande promueve la proliferación celular, facilitando la revascularización y el transporte de oxígeno y nutrientes. Poros del tamaño de 300-400 micras son óptimos para la regeneración ósea *in vivo*, ya que permiten la migración de los vasos sanguíneos y promueven una migración más rápida de las células en las estructuras porosas, dado que el tamaño promedio de las células óseas es de 10 micras. Debido a que

estas construcciones imitan los tejidos viables, deben ser funcionales, estructurales y mecánicamente similares a los tejidos sanos, y en algunos casos orientar el desarrollo del tejido ó suministrar medicamentos y factores (Muzzarelli 2011, Arpornmaeklong 2006, Yong 2000).

Los andamios hechos de polímeros biodegradables han desempeñado un papel fundamental como sustituto óseo. Para la sustitución de los huesos, los materiales deben cumplir varios requisitos, tales como biocompatibilidad, osteogenicidad, la maleabilidad, la biodegradabilidad. Sin embargo, estos materiales ponen de manifiesto algunas desventajas, entre ellas la resorción ósea, respuesta inmune, baja biodegradabilidad y una mala adaptación (Yoon 2000, Yong 2000).

Los sustitutos óseos deben ser bio-activos, bio-compatibles, bio-degradables ó bioabsorbidos, además de favorecer el crecimiento óseo por conducción y si es posible por inducción. Estas características dependen de las propiedades físicas y químicas de los biomateriales, los cuales deben ser compatibles con las reacciones fisiológicas del hueso. El proceso dinámico de remodelación envuelve la neoformación y la reabsorción ósea, caracterizando la casi total ausencia de cicatriz. A pesar de ello, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea, necesitando factores que estimulen la reparación. La velocidad de reparación del hueso es inferior a la de otros tejidos, motivo por el cual también en algunos casos es necesaria la utilización de materiales de reconstrucción ósea que actúen como injertos y auxiliien el proceso de reparación ósea (Martinez 2009, Duque 2009).

Los métodos de fabricación de los andamios buscan controlar la arquitectura de los mismos a diferentes niveles pues tanto la forma externa como la estructura interna son parámetros de diseño de ingeniería necesarios para lograr la regeneración de tejido (Velasco 2010).

Los materiales para implantes óseos deben poseer las siguientes propiedades:

Biocompatibilidad: integrarse al organismo hospedero sin que haya efectos citotóxicos, genotóxicos ó respuesta inmune. Esta es una propiedad fundamental de los biomateriales.

Biodegradabilidad: degradarse y que sean lo más cercanas posibles a las tasas de formación de hueso nuevo. Esto constituye un reto a la biocompatibilidad debido a que los productos de la degradación no deben ser tóxicos.

Resistencia y compatibilidad mecánica: resistir cargas mecánicas según sea la posición del tejido óseo que reemplaza. Las propiedades mecánicas como elasticidad, la resistencia a la tracción, a la fractura, deben ser lo más cercano posible al tejido que reemplaza (compatibilidad mecánica).

Osteoinductividad: promover la fijación de la formación de células específicas del tejido óseo. Esto se logra al reclutar células madre mesenquimales y osteoprogenitoras para que posteriormente proliferen y se diferencien hacia la línea osteogénica.

Osteoconductividad: actuar como soporte estructural en la formación y crecimiento de nuevo hueso. Esta propiedad se combina con la biodegradabilidad pues el material del implante debe ser reabsorbido para dar espacio al nuevo tejido que inicialmente ayudó a soportar.

Radiolucidez: diferenciarse radiográficamente con respecto al tejido donde se implantó (Velasco 2010).

El desarrollo de la ingeniería de tejidos en el área de biomateriales exhibe materiales que cumplen en mayor o menor grado estas propiedades. Existen familias de materiales con características que les hacen útiles para un rango específico de aplicaciones clínicas por lo que según sea la aplicación se debe seleccionar el biomaterial. El reto es desarrollar andamios que cumplan la funcionalidad del hueso e imiten sus propiedades y proporcionen un soporte temporal que ayuden al proceso de regeneración ósea (Velasco 2010).

I.4 Quitosán

Desde que los seres vivos aparecieron, la quitina junto con la celulosa los ha beneficiado en general y han mantenido un balance ecológico. Los vertebrados, y también las plantas no pueden producir quitina. La quitina es la versión animal de la celulosa y es el segundo polímero más abundante en la naturaleza. Tiene una edad de al menos 570 millones de años, al haber sido encontrada en el exoesqueleto de artrópodos acuáticos fósiles conocidos como trilobites, que datan de la era paleozoica (Miranda 1999, Larez 2006).

Un *polímero* es cualquier molécula de cadena larga formada por subunidades moleculares repetidas, los *biopolímeros* son simplemente polímeros producidos naturalmente. Compuestos como la celulosa, almidón y la quitina son ejemplos de polisacáridos, considerada ésta última el segundo polisacárido más común en la naturaleza después de la celulosa. La palabra “*quitina*” proviene del griego *tunic*, que significa envoltura, se identificó por primera vez en el exoesqueleto de hongos, y hoy se demuestra que la acetilglucosamina es la unidad estructural de la quitina, al igual que la glucosa es la unidad estructural de la celulosa (Barrientos 1999, Larez 2006).

La quitina es un polisacárido ramificado de glucosa, ampliamente distribuido en la naturaleza como el principal componente del exoesqueleto de crustáceos, artrópodos, insectos y algas unicelulares, así como de las paredes celulares de algunas bacterias y hongos. Químicamente se describe como β -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa, en la naturaleza se encuentra en varias configuraciones, α , β , γ , siendo la primera la más abundante. Está formada por unidades de amino azúcares unidas por enlaces del tipo β -1-4, los grupos amino se encuentran acetilados, por lo que la quitina corresponde a una amida de ácido acético. Estructuralmente es similar a la celulosa, difiere químicamente de esta en que el grupo funcional amida de la quitina reemplaza al grupo funcional hidroxilo de la celulosa en el segundo carbono de cada subunidad de azúcar. El grupo amida de la quitina es muy reactivo, por lo que de la quitina se pueden obtener fácilmente derivados. La quitina es blanca, dura, inelástica y es la mayor fuente de contaminación superficial de las áreas cercanas al mar (Senel 2004, García 1999, Barrientos 1999, Lemus 2007).

Del uso de los desechos generados del consumo e industrialización de crustáceos es posible la obtención de este polímero natural biodegradable y su derivado quitosán: el cual

es obtenido de la desacetilación alcalina de la quitina, químicamente descrito como (1-4) - 2- amino-2-deoxi-β-D-glucosa, siendo un polielectrólito hidrofílico y un polímero natural de alto peso molecular, es un polímero único de gran importancia, se compone de copolímeros de glucosamina y con niveles variables de N-acetil glucosamina (García 1998, Cruz 1999, García 1999, Senel 2004, Guzmán 2009, Yong 2000).

Para la obtención del quitosán se extrae la materia prima de los desechos del camarón, es pasado por un proceso de molienda, para posteriormente ser desproteinizado y desmineralizado, obteniendo así la quitina, misma que es pasada por un proceso de desacetilación y finalmente obteniéndose el quitosán (García 1999).

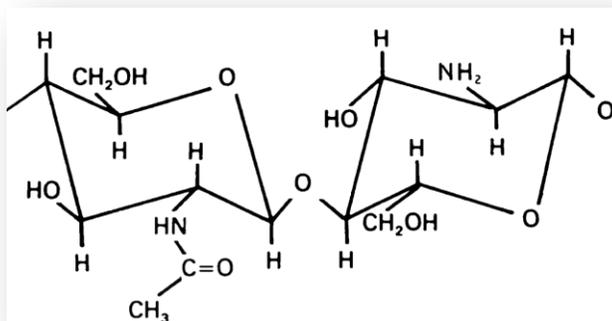


Fig. 1 Estructura química de la quitina y quitosán (Abarrategui 2008).

Existen varias publicaciones sobre la aplicación de la quitina y del quitosán dentro del campo de la medicina como: anticoagulantes, cicatrizantes estimulantes del sistema inmune, en la elaboración de suturas clínicas, en implantes de hueso y en tratamientos ortopédicos, ha sido utilizado para elaborar membranas de diferentes propósitos médicos y odontológicos. En medicina veterinaria, se utiliza como acelerador de la cicatrización de heridas, regeneración ósea, efectos analgésicos y antibióticos. Los efectos de la quitina y quitosán en la cicatrización de la herida se han demostrado en perros, gatos, ganado y animales de zoológico utilizando productos ya comercializados en Japón. En comparación con la terapia convencional, la administración de antibióticos a una herida, los nuevos tratamientos con quitina y quitosán, permiten una disminución sustancial en la frecuencia de tratamiento con mínima formación de cicatriz (Senel 2004, Garzón 1998, Hiroshi 2001).

Las principales aplicaciones que tienen actualmente estos materiales en las diferentes áreas son:

Agricultura: son muchísimas las aplicaciones en este campo que se han venido desarrollando, entre las más comunes tenemos:

- ✓ Recubrimiento de semillas con películas de quitosán para su conservación durante el almacenamiento.
- ✓ Sistemas liberadores de fertilizantes.
- ✓ Agente bactericida y fungicida para la protección de plántulas (inicio de las plantaciones).

Medicina: hoy en día se sabe que la quitina y el quitosán han sido usados desde la antigüedad para acelerar el saneamiento de heridas. Por ejemplo, los antepasados de los coreanos usaban la quitina en el tratamiento de abrasiones (obteniéndola a partir de las plumas del calamar) y los antepasados de los mexicanos aplicaban quitosán para la aceleración de la cicatrización de heridas (obteniéndolo de las paredes celulares de algunos hongos).

En la actualidad, entre los usos médicos más sencillos de estos materiales podemos mencionar:

- ✓ Producción de suturas quirúrgicas a partir de quitina.
- ✓ Producción de gasas y vendajes tratados con quitosán.
- ✓ Cremas bactericidas para el tratamiento de quemaduras.

Tratamiento de aguas: es una de las áreas más importantes debido a que el quitosán y la quitina son sustancias “ambientalmente amigables”. Entre los principales usos que se hacen en la actualidad de estos biomateriales, y algunos de sus derivados, en este campo tenemos:

- ✓ Coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y alta alcalinidad.
- ✓ Floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites de pescado.
- ✓ Captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas. Algunos copolímeros de injerto del quitosán muestran alta efectividad para remover metales pesados, especialmente los derivados de ácidos alquenodióicos.

Cosméticos: es amplia la aplicación de ambos biopolímeros en este campo. Se mencionan tres de las más conocidas:

- ✓ Fabricación de cápsulas para adelgazar, denominadas “atrapagrasas”. Quizás sea la aplicación más extensamente aprovechada del quitosán (Outfat es solo una de las marcas más conocidas).
- ✓ Aditivo bactericida en jabones, champús, cremas de afeitado, cremas para la piel, pasta dental, etc.
- ✓ Agente hidratante para la piel, debido a que sus geles pueden suministrar agua y evitar la sequedad. Además, el quitosán forma una película que ayuda a dosificar otros principios activos.

Biosensores: son numerosísimas las aplicaciones del quitosán en este campo, especialmente como soporte para la inmovilización de enzimas sensibles a un sustrato específico. Algunos ejemplos son:

- ✓ Sensor para glucosa en sangre humana, basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa sobre quitosán, usando adicionalmente Azul de Prusia.
- ✓ Sensor para la detección de fenoles en aguas de desecho en plantas industriales, basado en la inmovilización de la enzima tirosinasa.
- ✓ Sensores basados en la inmovilización de nano partículas espacialmente ordenadas (Larez 2006, Miranda 2011).

Cuando la estructura no está desacetilada, el nitrógeno forma parte de un grupo amida. A partir de un 50% de desacetilación, se considera que el polímero es quitosán en vez de quitina. Además a su falta de toxicidad y alergenidad, su biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad lo convierten en una atractiva sustancia además tiene características humectantes y antibacterianas, y se usa para diversas aplicaciones como biomaterial en los campos farmacéuticos y médicos, donde se ha utilizado para la administración local y sistémica de fármacos y vacunas. La producción industrial de quitina y quitosán se realiza, por lo general, a partir de exoesqueletos de cangrejo y camarón, desechados de las industrias pesqueras. El hecho de que el quitosán está disponible y sea empleado en numerosas aplicaciones comerciales, provee un estímulo para idear nuevos métodos de adaptación de esta valiosa fuente de polímero biodegradable (Abarrategui 2008, Senel 2004, Lemus 2007, Miranda 2000, Chunmeng 2006).

El quitosán puede tener diferentes grados de desacetilación. Tiene tres tipos de grupos funcionales reactivos, un grupo amino y grupos hidroxilo primarios y secundarios en el C-

2, C-3, y las posiciones C-6, respectivamente. Es normalmente insoluble en condiciones de pH neutro o básico, mientras que es soluble en pH ácido. Es de naturaleza catiónica, es el principal responsable de las interacciones electrostáticas con los glicosaminoglicanos aniónicos (GAG), proteoglicanos y otras moléculas con carga negativa. Esta propiedad permite que el quitosán pueda conservar y concentrar las biomoléculas ya que un gran número de citoquinas y factores de crecimiento están relacionados con GAG. El quitosán se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de algunas plantas y hongos (Chunmeng 2006, Muzzarelli 2009, Larez 2006).

Entre sus propiedades más importantes del quitosán se encuentran: su alta densidad de carga, por la unidad de glucosamina, es un excelente floculante debido a su gran número de grupos $-NH_3^+$ que pueden interactuar con los coloides cargados negativamente. Se adhiere fácilmente a los polímeros naturales semejantes al pelo y piel. El grado de acetilación representa la proporción de unidades N-acetil-D-glucosamina con respecto al número total de unidades. La viscosidad de la solución de quitosán aumenta con la concentración del mismo, la disminución de la temperatura con el alto grado de desacetilación, que es un parámetro estructural, que también puede influir en las propiedades físico-químicas tales como el peso molecular, la elasticidad y la resistencia a la tracción. La viscosidad también influye en las propiedades biológicas tales como la cicatrización, mejora de la osteogénesis, es biodegradado por la biodegradación de la lisozima. Además es un polímero en ambientes ácidos, posee una capacidad de formar geles en los valores de pH ácido, ya que es hidrofílica y pueden retener el agua en su estructura (García 1998. Senel 2004).

Quitosán aumenta las funciones de las células inflamatorias tales como leucocitos polimorfonucleares (PMN) (fagocitosis, producción de osteopontina y el leucotrieno B4), macrófagos (fagocitosis, producción de interleucina (IL-1), factor de crecimiento transformante $\beta 1$ y factor de crecimiento derivado de plaquetas). Como resultado, el quitosán promueve la granulación y la organización. La quitina y el quitosán inducen a los fibroblastos para liberar interleucina-8, que interviene en la migración y proliferación de fibroblastos y células endoteliales vasculares. Algunos estudios mencionan que promueve la producción de TGF- $\beta 1$ y PDGF e indican que el quitosán no induce directamente la producción de matriz extracelular por los fibroblastos, sino, más bien, por los factores de

crecimiento. También promueve la angiogénesis y la expresión de citocinas, se cree que los oligosacáridos de quitosán tienen un efecto estimulante en los macrófagos, y tanto el quitosán y la quitina son quimioatrayentes para los neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto este biopolímero puede estimular la cicatrización de heridas, ya que promueve la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular (Senel 2004, Hiroshi 2001, Muzzarelli 2009).

Una peculiaridad del quitosán es la capacidad de fomentar una adecuada formación de tejido de granulación acompañado de la angiogénesis y la deposición regular de las fibras de colágeno. De hecho, los principales efectos bioquímicos de quitina y quitosán son activación de los fibroblastos, la producción de citocinas, la migración de células gigantes y la estimulación de la síntesis de colágeno tipo IV (Muzzarelli 2009).

La hemostasia se obtiene inmediatamente después de la aplicación de la mayoría de los productos comerciales de la quitina basada en apósitos para heridas traumáticas y quirúrgicas: las plaquetas se activan por la quitina con efectos redundantes y prestaciones superiores en comparación con los materiales conocidos como hemostáticos. Para promover la angiogénesis es necesario apoyar la formación de tejido fisiológicamente ordenado, regulando la producción del factor de crecimiento endotelial vascular. El quitosán ha demostrado que proporciona inhibición de la proliferación bacteriana en el tratamiento de heridas infectadas. La actividad antimicrobiana de quitosán ha sido reconocida en contra de varias bacterias y hongos, pero los efectos inhibitorios difieren en cuanto al peso molecular y el grado de desacetilación del quitosán y el tipo de bacteria. Generalmente ejerce un mayor efecto bactericida contra bacterias gram-positivas que bacterias gram-negativas. La actividad antibacteriana de quitosán se ve afectada por el pH, con una mayor actividad en los valores de pH más bajos. Además se demostró que el quitosán tiene la capacidad para promover el reclutamiento de células osteoprogenitoras, lo que facilita la formación de hueso, también estimula la médula ósea. El quitosán es también capaz de activar las defensas del huésped para prevenir la infección, ofreciendo así una alternativa al uso de antibióticos (Muzzarelli 2009, Chunmeng 2006, Senel 2004, Lemus 2007, Jue 2002, Guzmán 2009).

De gran importancia es la capacidad del quitosán para unirse a compuestos aniónicos tales como factores de crecimiento, glicosaminoglicanos y el ADN. La versatilidad de

quitosán y sus derivados ofrecen una amplia gama de aplicaciones, ya que son biodegradables, no tóxicos y se pueden formular en una variedad de formas, como polvos, geles y películas para las aplicaciones, para su aplicación con diferentes requerimientos. Entre otras propiedades, el quitosán se puede combinar con una variedad de materiales biológicos, tales como: alginato, hidroxiapatita, ácido hialurónico, fosfato de calcio, polimetilmetacrilato (PMMA), el ácido poli-Láctico (PLLA), y factores de crecimiento para su posible aplicación. Además, tiene buenas propiedades de formación de película y por lo tanto, es utilizado como vehículo preferido para la liberación de drogas ya que se ha utilizado como un excipiente seguro en las formulaciones de medicamentos en las últimas dos décadas. Este polímero también atrajo la atención de los científicos como un polímero mucoadhesivo y bioadhesivo ya que pueden adherirse a los tejidos duros y blandos, que se ha utilizado en la odontología, ortopedia, oftalmología y en los procedimientos quirúrgicos (Chunmeng 2006, Muzzarelli 2009, Senel 2004, Guzmán 2009, Lemus 2007).

Este polímero resulta muy interesante en el campo de los biomateriales debido principalmente a su carácter biocompatible y su baja o nula toxicidad. Además, es biodegradable, lo que constituye un requisito necesario en numerosas aplicaciones biomédicas. Destaca su uso para la preparación de apósitos y vendajes, que se usan para el tratamiento de heridas y para la regeneración y reparación tisular. Actualmente se está estudiando su uso en diferentes aplicaciones biomédicas. Se está utilizando actualmente para el tratamiento en la medicina veterinaria, debido a sus propiedades biológicas diferentes (Abarrategui 2008, Senel 2004).

Una de las características más prometedoras de quitosán es su excelente capacidad para ser transformados en estructuras porosas para su uso en el trasplante de células y la regeneración tisular, la medicina regenerativa ha entrado en una nueva era con el desarrollo de la ciencia y la tecnología modernas. (Chunmeng 2006, Senel 2004).

Los ensayos clínicos efectuados con el fin de promover el quitosán como biomaterial, no reportan reacciones alérgicas después de la implantación, inyección, ingestión o aplicación tópica en el cuerpo humano. Varios materiales inyectables basándose en quitosán y sus derivados han sido utilizados como sustitutos óseos ya que estimulan la diferenciación de células osteoprogenitoras facilitando así la formación de hueso y la osteoconducción. El quitosán respeta la formación ósea fisiológica y los procesos de

curación, y lo más importante es que mejora favorablemente las respuestas bioquímicas, gracias a sus propiedades inherentes inmunoestimulantes y la susceptibilidad a la lisozima. La regeneración del cartílago también es factible ya que el quitosán mantiene la correcta morfología de los condrocitos y conserva su capacidad para sintetizar células específicas de la matriz extracelular. (Muzzarelli 2011, Hiroshi 2001, Senel 2004).

En general se reporta que estos materiales no son tóxicos y biodegradables con tejidos vivos, provocan una reacción mínima de cuerpo extraño con encapsulación fibrosa poco o nada. Se cree que el quitosán es fácilmente hidrolizado por quitosanasas diferentes, que están completamente ausentes en los mamíferos, y dependiendo del grado de desacetilación, por la lisozima. Su biodegradación lleva a la liberación de los aminoazúcares, que pueden ser incorporados en glicosaminoglicanos y como consecuencia por la liberación de estos tales como los monómeros de la glucosamina y N-acetilglucosamina y oligómeros, y la estimulación de las actividades celulares, la actividad antimicrobiana intrínseca. La lisozima es la principal enzima responsable de la degradación *in vivo* de quitosán a través de la hidrólisis de los residuos acetilados. La degradación por las enzimas bacterianas se demostró que era dependiente tanto de peso molecular y grado de desacetilación de la muestra de quitosán (Senel 2004, Chumeng 2006, Muzzarelli 2009).

De este biomaterial también se crean andamios con propiedades mecánicas que dependen en gran medida del tamaño de los poros y las orientaciones de los poros. Los andamios pueden aumentar la reparación ósea mediante el apoyo a la proliferación de las células osteoblásticas, así como su diferenciación. Han reportado cierta actividad osteogénica y mineralización ósea en defectos óseos artificialmente en modelos animales, el quitosán es un prometedor andamio para la ingeniería de tejido cartilaginoso (Senel 2004, Chunmeng 2006).

Quitosán y el colágeno se encuentran entre los polímeros naturales biodegradables más utilizados como andamiaje de tejido. La reconstrucción periodontal con quitosán fue el preludeo del descubrimiento de las propiedades del quitosán como andamio osteoinductivo. Puede funcionar como un sustrato que aumenta la migración y diferenciación de células progenitoras por su capacidad de formación de hueso *in vivo*. Las funciones adicionales para los andamios del quitosán además de acortar el período de formación ósea y mejorar la eficacia de la formación de hueso ha demostrado ser útil en la de la incorporación de

agentes bioactivos y su regulación en la liberación tales como factores de crecimiento (Arpornmaeklong 2006, Muzzarelli 2011, Yoon 2000).

II. OBJETIVOS

II.1. General

- Evaluar la capacidad de osteointegración de un biomaterial (quitosán) durante la reparación ósea en osteotomías en conejos.

II.2. Particulares

- Evaluar clínicamente la integración del quitosán en un defecto óseo en conejos.
- Evaluar radiológicamente la integración del quitosán en la reparación ósea en conejos.
- **Evaluación** histológicamente la integración del quitosán en un defecto óseo en conejos.

III.HIPOTESIS

Si el uso del quitosán a través de sus características biomoleculares de biodegradación, compatibilidad y adaptación en tejidos puede ser utilizado en la producción de materiales sustitutos de hueso, entonces, al aplicarse en un defecto óseo en conejos se integrará satisfactoriamente durante el proceso de la reparación ósea.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Nuestro trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, UNAM. Localizada en el km. 2.5 de la carretera Cuautitlán Teoloyucan, Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. La permanencia de los animales de experimentación y los procedimientos quirúrgicos se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), en el área del bioterio. Por otro lado la toma de placas radiográficas y el procesamiento de muestras para las evaluaciones histológicas se realizaron en las áreas correspondientes del Departamento de Ciencias Biológicas, finalmente los análisis clínicos fueron procesados en un laboratorio particular.

El trabajo fue puesto a consideración y fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y uso de los Animales de Experimentación de la Facultad (CICUAE – FESC) y registrado con el número de protocolo C10_39.

IV.1. Material biológico

Todos los animales utilizados en este trabajo fueron tratados de acuerdo a la especificaciones técnicas para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y de la Guide for the care and use of Laboratory Animals de los Estados Unidos.

Se utilizaron 9 conejos de raza Nueva Zelanda, machos, sanos, obtenidos del módulo de conejos de la FESC, de 2.5-3.0 kg de peso, todos los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación de 15 días previos al experimento, alojados en jaulas individuales específicas para conejos, en la UIM, donde fueron alimentados con alimento comercial y agua *ad libitum*. Los animales fueron seleccionados en forma aleatoria en tres grupos (n=3) y sometidos a cirugía, siguiendo los preceptos de la cirugía moderna y previo a esta fueron evaluados clínicamente con pruebas de laboratorio, posteriormente fueron eutanaciados a las 3, 4 y 5 semanas para la obtención de muestras.



Imagen 1. Conejo Nueva Zelanda alojado en la UIM

IV.2. Obtención del biomaterial

El biomaterial fue elaborado y obtenido por donación del laboratorio de Biotecnología de la FESC-C1. Solicitud de patente: “Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosán”. En trámite. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. No. de expediente 005444. Mayo 31 (2000). No. de folio 1175930-5.

Se utilizaron esponjas de quitosán las cuales fueron caracterizadas de la siguiente manera:

Peso	0.0037g
Humedad	9.5%
pH	5.5
Concentración	1%
Diámetro	4mm
Forma	cilíndrica

Cuadro 1. Caracterización de las esponjas de quitosán.



Imagen 2. Esponjas de quitosán

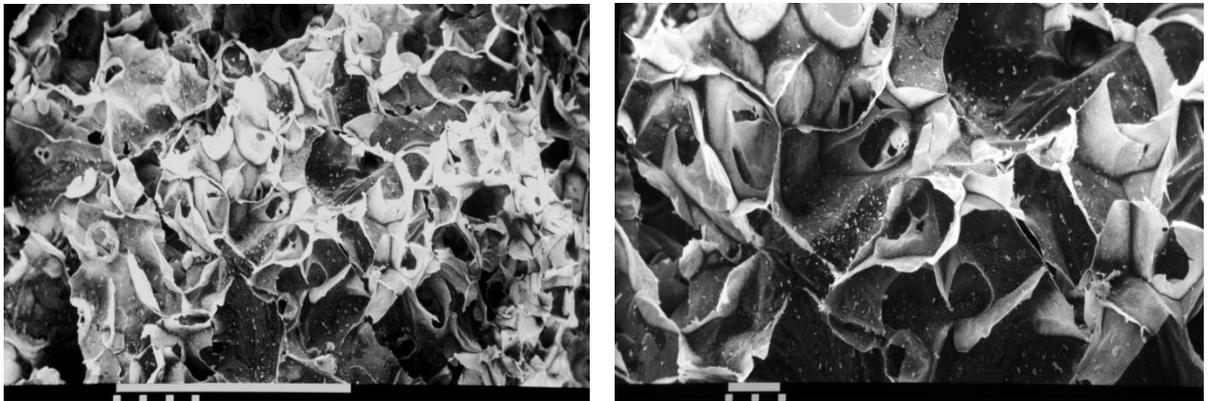


Imagen 3. Esponja de quitosán 45X barra de 1000 micras, 100X barra de 1000 micras respectivamente.

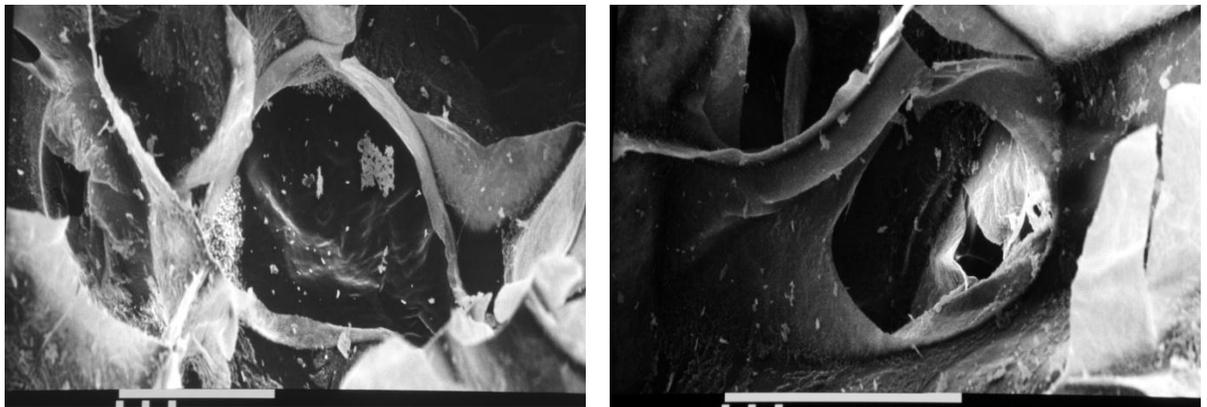


Imagen 4. Esponja de quitosán 300X barra de 1000 micras, 450X barra de 1000 micras respectivamente.

IV.3. Preparación quirúrgica

Todos los animales fueron puestos en ayuno de 12 horas antes de la cirugía, se prepararon siguiendo los principios básicos de asepsia quirúrgica; rasurando ambos miembros posteriores de la parte distal del fémur hasta el tercio proximal de los tarsos, se colocó un catéter intravenoso de calibre 24G en la vena marginal, conectado a un equipo de venoclisis microgotero (60gotas/ml.), con una solución isotónica de cloruro de sodio 0.9%, perfundiendo 10ml/kg/h para mantenimiento durante la cirugía. Los animales fueron anestesiados utilizando una combinación de ketamina-xilacina (Anestek y Andozine) a dosis de 20 mg y 5 mg / kg de peso vivo respectivamente.



Imagen 5. Conejo rasurado y canalizado en el prequirúrgico.

IV.4. Técnica quirúrgica

Se colocó a los pacientes en decúbito lateral sujetando el miembro (izquierdo o derecho) en alto durante toda la cirugía, se realizó la antisepsia con tintura de benzal en la zona y se colocaron los campos quirúrgicos.

Se realizó un abordaje quirúrgico al cuerpo de la tibia, sobre el tercio proximal a través de una incisión de aproximadamente 3cm sobre la piel y tejido subcutáneo, posteriormente se incidió la fascia de los músculos flexores y extensores, con el hueso expuesto se procedió a desperiostizarlo, posteriormente se les realizó dos defectos óseos de 4 mm de diámetro utilizando una broca ortopédica y un taladro marca Skyl de baja revolución (350 rpm). A la tibia derecha se le colocó dentro de cada defecto óseo una esponja del mismo diámetro elaboradas con el biomaterial quitosán, mientras que a la tibia

izquierda después de realizarle los defectos, no recibió ningún tratamiento, sirviendo como control. Se procedió a reparar los planos anatómicos incididos, para lo que se utilizó en el plano muscular la técnica de puntos en X con una sutura de monofilamento de gliconato 4/0, y para piel puntos discontinuos simples utilizando monofilamento de nylon 4/0.

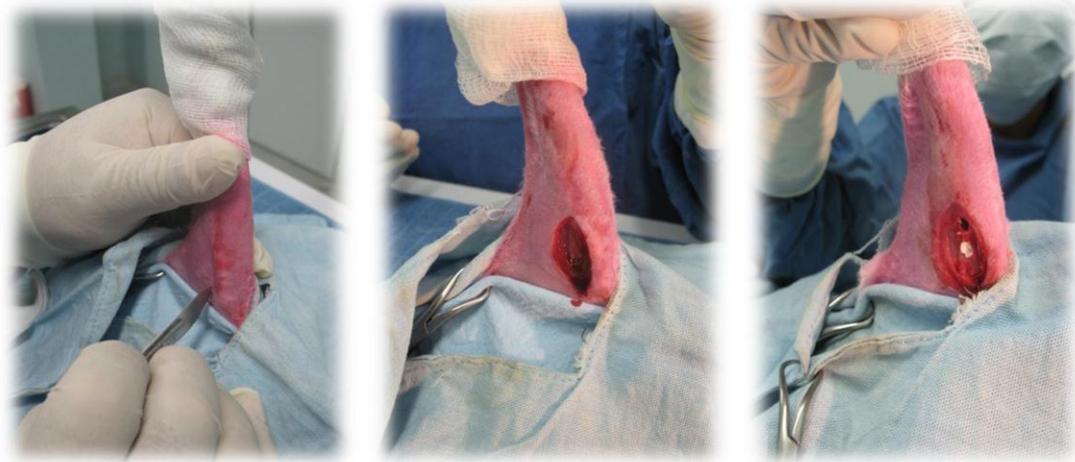


Imagen 6. Incisión quirúrgica y colocación del quitosán en la tibia derecha.

Se administró un tratamiento profiláctico antibacteriano a base de ampicilina a dosis de 20 mg/kg cada 24 horas vía IM durante 7 días; para el control del dolor se utilizó meglumina de flunixin a dosis de 1.1 mg/kg cada 12 horas vía IM por 5 días, así como citrato de fentanilo 0.02 mg/kg por vía IM como dosis única.

IV.5. Evaluación clínica

Durante esta evaluación se observó diariamente el consumo de agua y alimento, así como también el cambio de comportamiento en cuanto a la agresividad, depresión o alguna alteración que nos pudiera sugerir malestar del animal. También se observó que defecaran y orinaran.

Posterior a la cirugía se observaron las heridas, que estuvieran limpias libres de exudado ó algún cambio que sugiriera necrosis y se tomaron medidas con un vernier del diámetro cráneo caudal, y medio lateral de la tibia control y experimental.

IV.6. Evaluación de laboratorio

Previo a la cirugía y a la eutanasia se tomaron de todos los animales muestras de sangre de la vena marginal de la oreja con un punzocat de 24G la cual fue extraída con una jeringa de 3ml, aproximadamente se obtuvieron 2ml y fue dividido para hemograma y fosfatasa alcalina sérica (FAS).

IV.7. Evaluación radiológica

A cada uno de los animales se les realizó una evaluación semanal con la toma de placas radiográficas (cráneo-caudal y medio-lateral) para ambas tibias. Las radiografías se analizaron considerando la respuesta ósea: perióstica, y la presencia de material radiopaco en el defecto óseo.

Respuesta perióstica	
Criterio	Valoración
No hay respuesta	0
Respuesta ligera	1
Respuesta regular	2
Respuesta abundante	3

Cuadro 2. Criterios de evaluación radiográfica de la respuesta perióstica.

Presencia de material radiopaco en el defecto	
Criterio	Valoración
Sin cambio	0
Ligera radiopacidad	1
Regular radiopacidad	2
Abundante radiopacidad	3

Cuadro 3. Criterios de evaluación radiográfica de la presencia de material radiopaco en el defecto.

IV.8. Evaluación histológica

Para la evaluación histológica se sacrificaron los animales por grupo a diferentes tiempos, el primero a las 3 semanas, el segundo a las 4 y el tercero a las 5, con una dosis de pentobarbital sódico de 60mg/kg intraperitoneal. Para la obtención de las muestras se diseccionaron ambas tibias, posteriormente se realizaron dos cortes transversales a cada una delimitando el fragmento de la fractura con una sierra, los cuales fueron sumergidas en frascos con formol al 10% y se tuvieron bajo refrigeración para su proceso durante 72 horas. Se descalcificaron en solución Bouin-Tricloroacético en la cual se mantuvieron por 72 horas. Posteriormente se cambiaron a carbonato de calcio 1 N durante 48 horas y se lavaron con agua destilada, una vez desmineralizadas las muestras para el procesamiento, se realizó un segundo corte longitudinal, identificándolas y colocándolas en caset para deshidratarlas en alcohol al 70, 80, 92, 98 y 100%, finalmente fueron colocadas en monómero de estireno durante 24 horas. Se incluyeron en parafina y se cortaron con un micrótopo de 5 micras. A las laminillas obtenidas se les realizó tinción de rutina HE. Se evaluó principalmente la integración del biomaterial y la respuesta ósea.

V. RESULTADOS

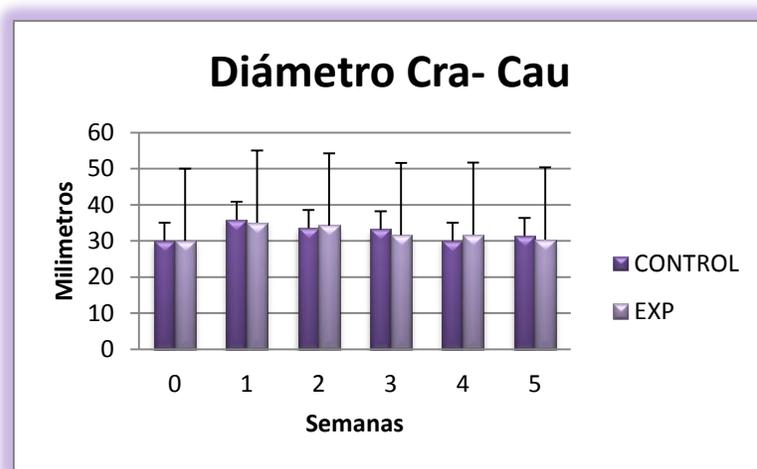
V.1. Evaluación clínica

En términos generales dentro de la evaluación clínica que se les realizó a todos los animales del experimento no se observaron cambios conductuales principalmente depresión, agresividad, hiporexia, adipsia. Así mismo, al someterlos a deambular no se observó alguna claudicación de los miembros después de la cirugía y hasta el término del experimento.

A la evaluación de las zonas de cirugía se pudo denotar que estas se encontraban limpias, libres de secreción, y no se observó evidencia de necrosis celular.

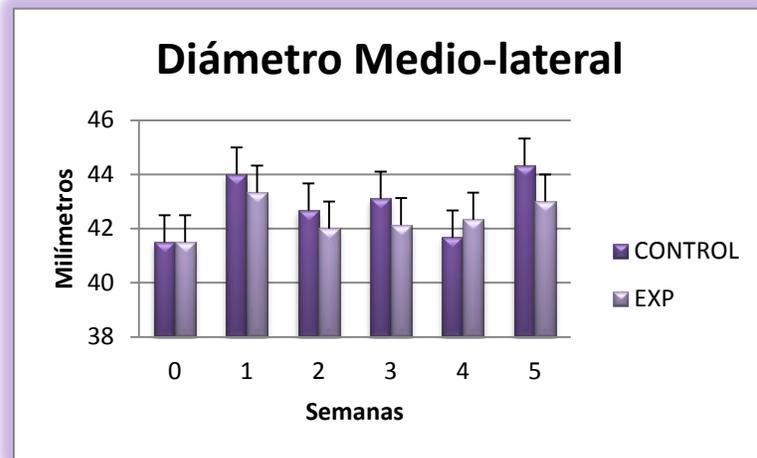
Por otro lado se tomaron las medidas del grosor de las zonas quirúrgicas a partir de la semana cero y se consideró el diámetro cráneo-caudal y el medio-lateral tal y como se observa en las gráficas 1 y 2 respectivamente.

En el diámetro cráneo-caudal se pudo observar un incremento en ambos miembros durante la primera semana, el cual fue disminuyendo conforme transcurrían la segunda y tercera semana llegando al diámetro normal a la cuarta y quinta semana, en el control y experimental respectivamente.



Gráfica 1. Diámetro cráneo-caudal de la tibia experimental y control

Con respecto al diámetro medio-lateral considerando que el defecto óseo y la aplicación del material se realizó en la cara medial de la tibia, pudimos observar lo siguiente: en términos generales los diámetros de los miembros controles fueron mayores que a los que se les puso el material (quitosán); e incluso en la semana 5 se observó un incremento exacerbado tal y como se observa en la gráfica 2.

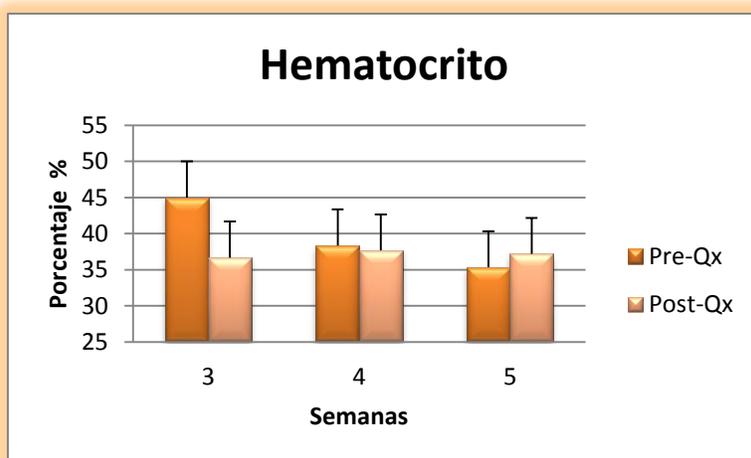


Grafica 2. Diámetro medio-lateral de la tibia experimental y control.

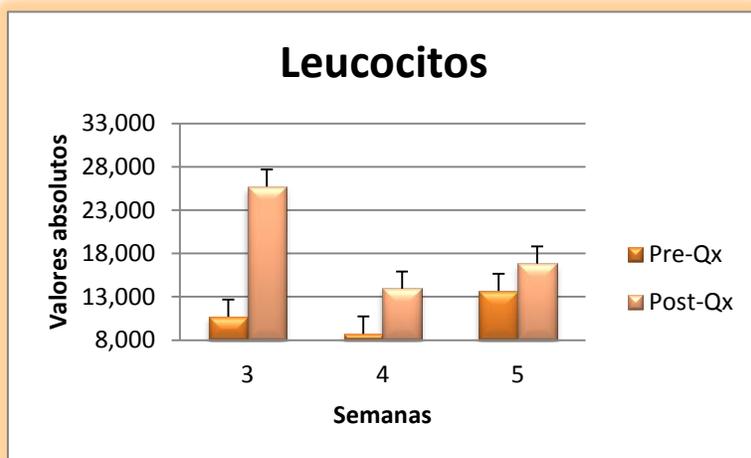
V.2. Evaluación de laboratorio

Durante la evaluación de los análisis de laboratorio, refiriéndonos al hematocrito, pudimos observar que los animales durante todo el experimento se mantuvieron dentro de los parámetros normales (30 a 50%), como se puede observar en la gráfica 3.

Por otro lado, el conteo total leucocitario durante el pre quirúrgico se vio incrementado en cada uno de los grupos, excepto el de las 4 semanas el cual se mantuvo dentro de los parámetros normales (9,000 a 10,000 leucocitos/dl); así mismo se repitió el incremento en todos los grupos durante todo el experimento, saliendo de los rangos normales, como se puede observar en la gráfica 4.

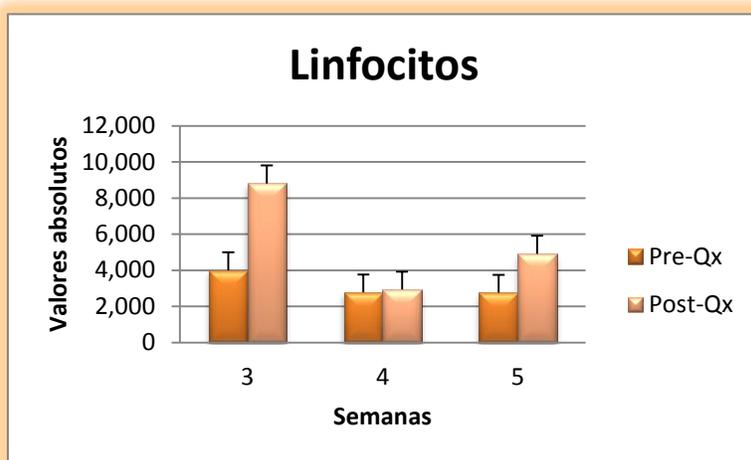


Gráfica 3. Valoración del hematocrito pre y post quirúrgicamente.

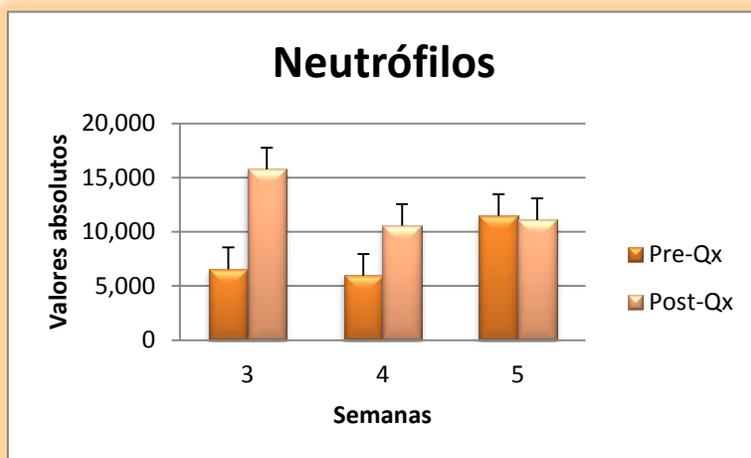


Gráfica 4. Valoración de leucocitos pre y post quirúrgicamente.

Referente a los linfocitos tal y como se muestra la gráfica 5, tendieron a incrementarse en los pos quirúrgicos, sin embargo, se mantuvieron dentro de los parámetros normales para esta especie (2,700 a 6,300 linfocitos/dl), excepto en el periodo post operatorio del grupo de las 3 semanas que registro 8,800 linfocitos. En cuanto a los neutrófilos los cuales sus parámetros normales son de 2,700 a 6,300 neutrófilos/dl, se observó y como se muestra la gráfica 6 que durante el pre quirúrgico solo el grupo de 5 semanas mostró un incremento (11,400). Mientras que en el posquirúrgico se observó un incremento considerable en el grupo de 3 y 4 semanas 15,700 y 10,500 respectivamente; y el grupo de las 5 semanas se mostraron muy similares al pos quirúrgico.

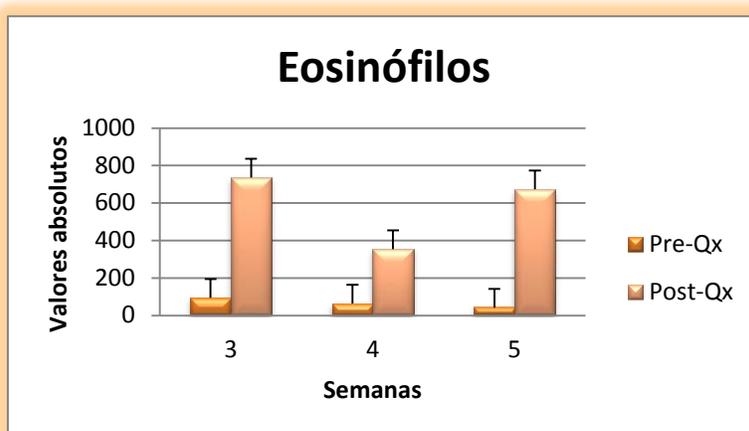


Gráfica 5. Valoración de linfocitos pre y post quirúrgicamente

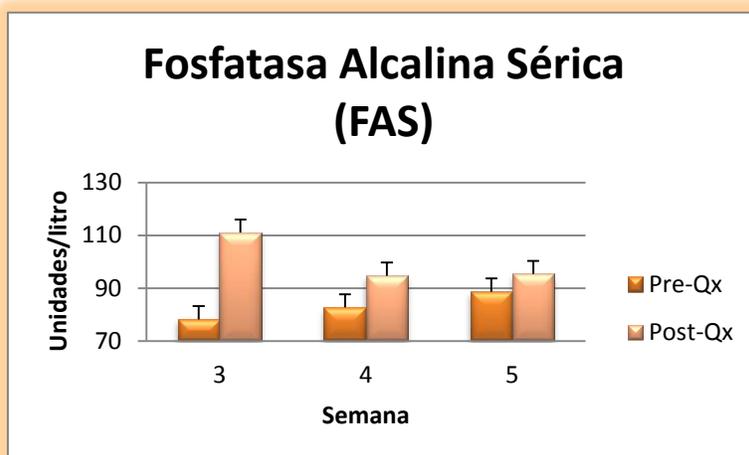


Gráfica 6. Valoración de neutrófilos pre y post quirúrgicamente

Respecto a los eosinófilos tal y como se muestra en la gráfica 7 todos los grupos durante la evaluación pre quirúrgica, se encuentran dentro de los parámetros normales (0-90 eosinofilos/dl); y durante la evaluación pos quirúrgica en los 3 grupos se observó un incremento exacerbado en todos los grupos, siendo el grupo de las 4 semanas el más bajo de los 3. Finalmente en la evaluación de la fosfatasa alcalina sérica pudimos observar que al comparar la evaluación pre quirúrgica con la post quirúrgica, se obtuvo un incremento de esta última sin que escapen de los parámetros normales (70-145 U/L) como se observa en la gráfica 8.



Gráfica 7. Valoración de eosinófilos pre y post quirúrgicamente.



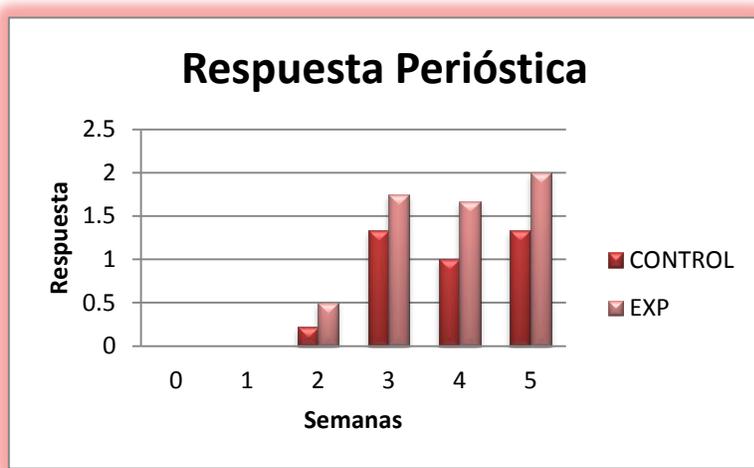
Gráfica 8. Valoración de Fosfatasa alcalina sérica pre y post quirúrgicamente.

V.3. Evaluación radiológica

Durante la evaluación radiológica, en la gráfica número 9 se puede observar la respuesta perióstica considerando la tabla de valoración que se citó en material y métodos.

Se puede observar que durante la primera semana no hubo cambios y a partir de la segunda semana tanto en los experimentales como en los controles, y que en el grupo experimental fue incrementándose hasta la semana 5, encontrándose mejor respuesta perióstica en este grupo que en los controles.

Con respecto a la respuesta endóstica no se observaron cambios que sugirieran la presencia de ésta.



Grafica 9. Valoración de la respuesta perióstica en las tibias control y experimentales.

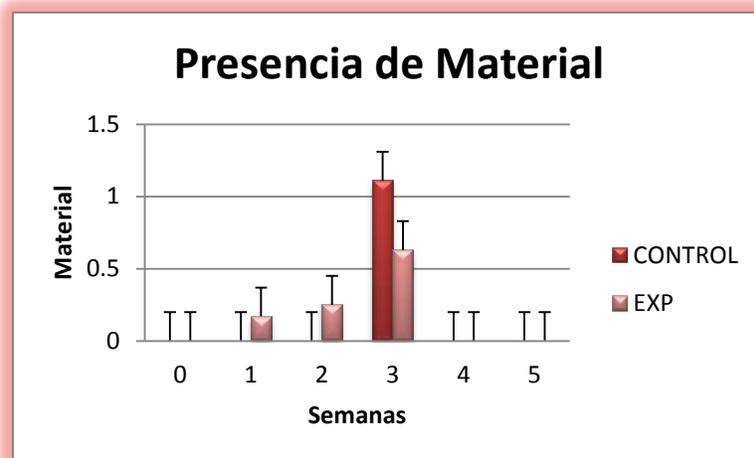
Finalmente la presencia de material radiopaco dentro del defecto tal y como se muestra en la gráfica 10, se pudo observar en el grupo experimental durante las tres primeras semanas y solo en el grupo control en la tercera semana. Esta evaluación se realizó en la toma medio- lateral.

Cabe mencionar que los grupos controles de 4 y 5 semanas no mostraron evidencia de algún material dentro del defecto óseo, sin embargo, se pudo apreciar que la densidad ósea era muy similar a la mostrada por la cortical del hueso sano. Los grupos controles de la semana 4 mostraron una imagen irregular en la zona del defecto y una densidad ligeramente disminuida con relación a las corticales sanas; en la tomas radiográficas

cráneo-caudales se pudo observar ciertas irregularidades sobre la zona del defecto, que corresponderían a las corticales mediales tornándose cóncavas. Los grupos experimentales en dos de los animales solo se pudo observar cierto cambio de densidad en la zona del defecto y en el tercer animal pudo apreciarse un incremento marcado de densidad, mientras que sus corticales en la toma cráneo-caudal se apreció también cóncavo sobre las corticales donde se realizó el defecto.

Durante la semana 5 en el grupo control se pudo observar un ligero cambio en la densidad de la zona del defecto lo que nos permite suponer que se encontraría casi reparado, e incluso en uno de los animales no se pudo distinguir ningún cambio de densidad en comparación con el resto del hueso. Así mismo en la toma radiográfica cráneo-caudal se detectaron corticales cóncavas o depresiones que corresponderían a los defectos ya reparados.

Con respecto al grupo experimental solo uno de los animales de la semana 5 pudo distinguirse cierto cambio de densidad en la zona del defecto; mientras que en la toma cráneo-caudal se pudieron observar corticales convexas.



Grafica 10. Valoración de la presencia del material en las tibias control y experimentales.

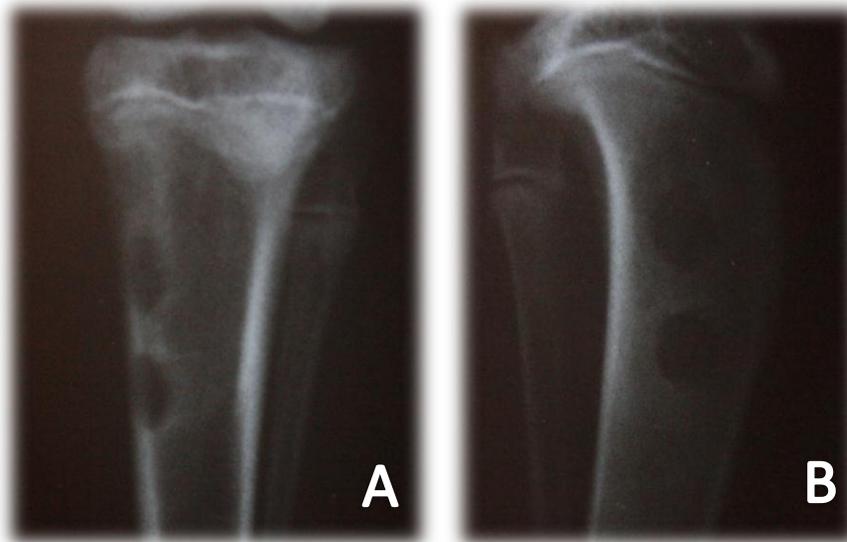


Imagen 7. Evaluación radiológica postquirúrgica control semana 1, tomas cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente, se observa en ambas tomas dos zonas radiolucidas circulares que corresponden a los defectos realizados.

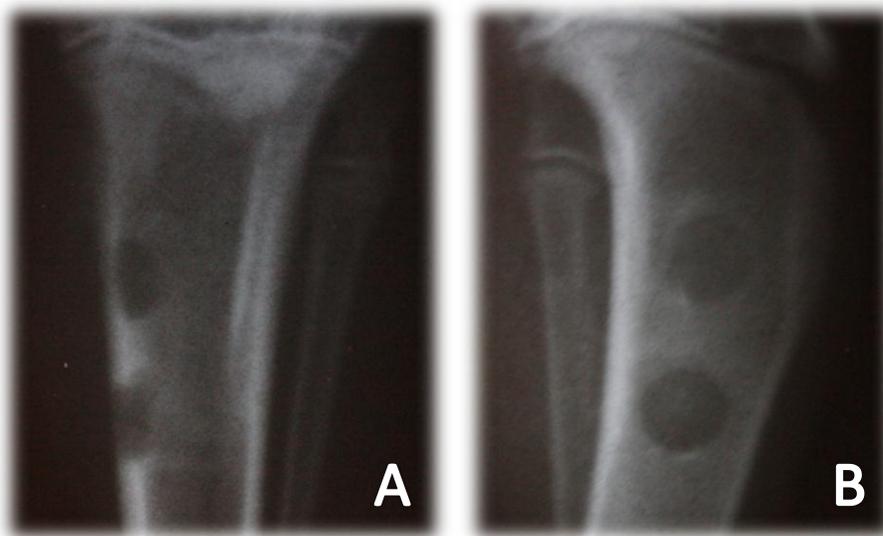


Imagen 8. Evaluación radiológica postquirúrgica, experimental semana 1, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente, donde se observan los defectos en los cuales fueron depositadas la esponjas de quitosán, las cuales no son radiopacas por su baja densidad.

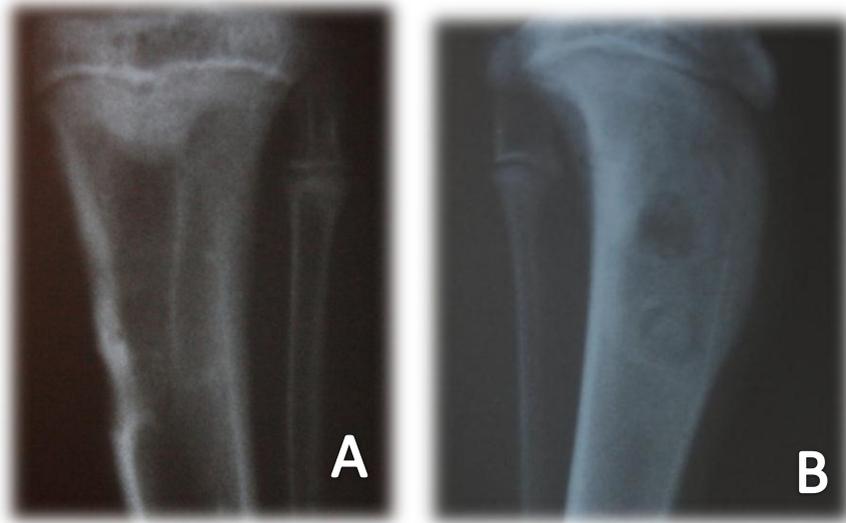


Imagen 9. Evaluación radiológica postquirúrgica, control semana 2, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente. Se pueden observar cambios en la cortical (A) que corresponden a la pérdida de material por el defecto.

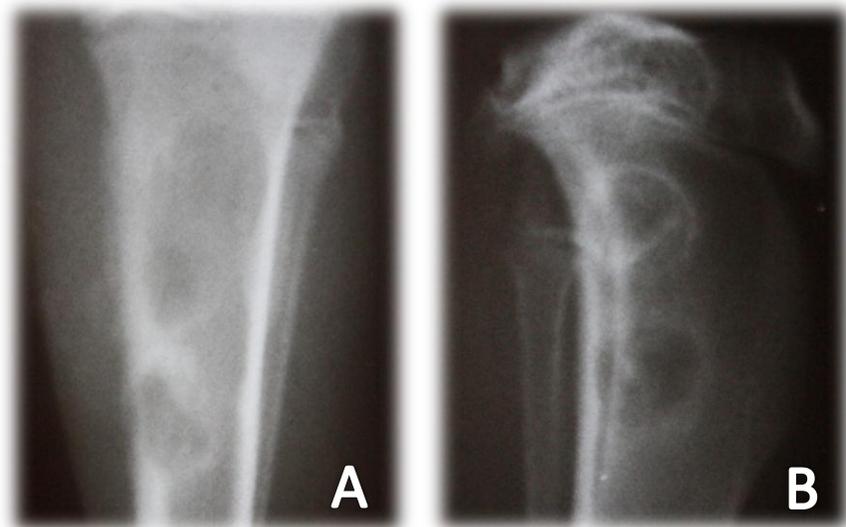


Imagen 10. Evaluación radiográfica postquirúrgica, experimental semana 2, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente. Se puede apreciar en la toma (B) un aumento de densidad en la zona del defecto que corresponde a la ocupación de la esponja de quitosán.

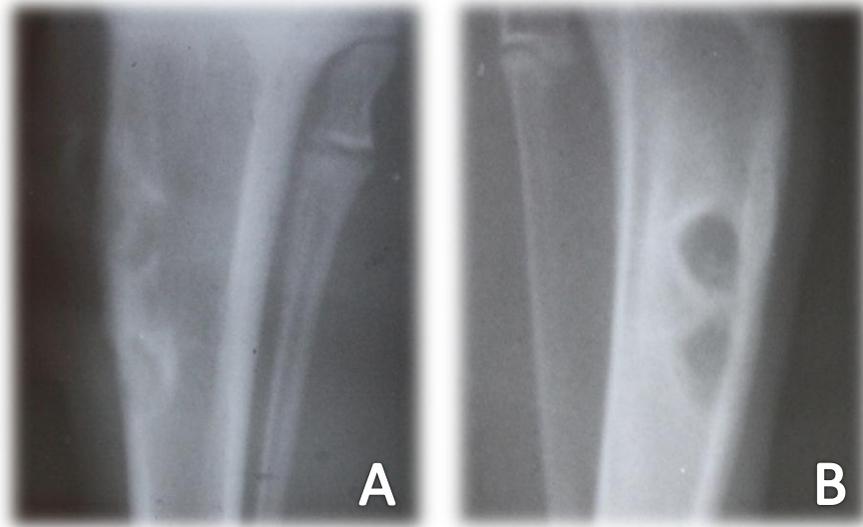


Imagen 11. Evaluación radiológica postquirúrgica, control semana 3, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente, donde se puede observar en la toma (A) ciertos cambios en la cortical que indican un proceso de reparación mientras que en la toma (B) se observan los defectos con cierto aumento de densidad.

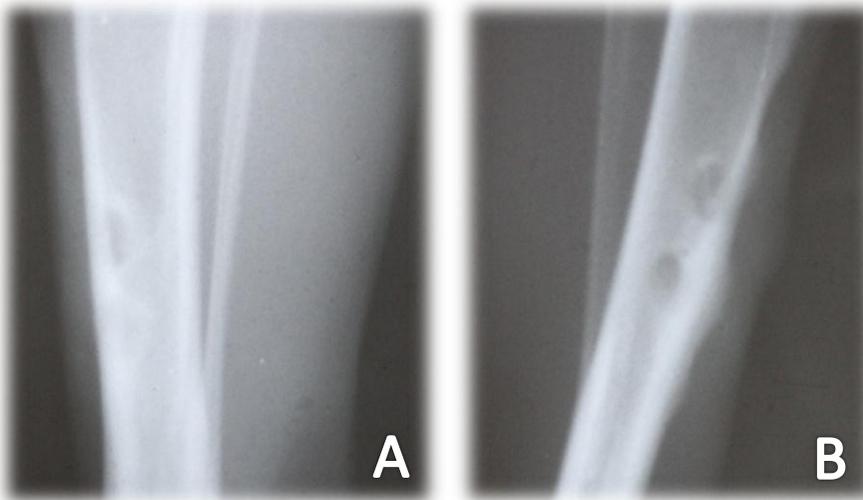


Imagen 12. Evaluación radiológica postquirúrgica, experimental semana 3, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente, en la toma (A) se observa un restablecimiento de la cortical que nos indica la reparación de los defectos mientras que en la toma (B) se llega a observar dentro de los defectos una mayor radiopacidad producida por la reparación también se observan cambios en la cortical que corresponde a la respuesta perióstica.

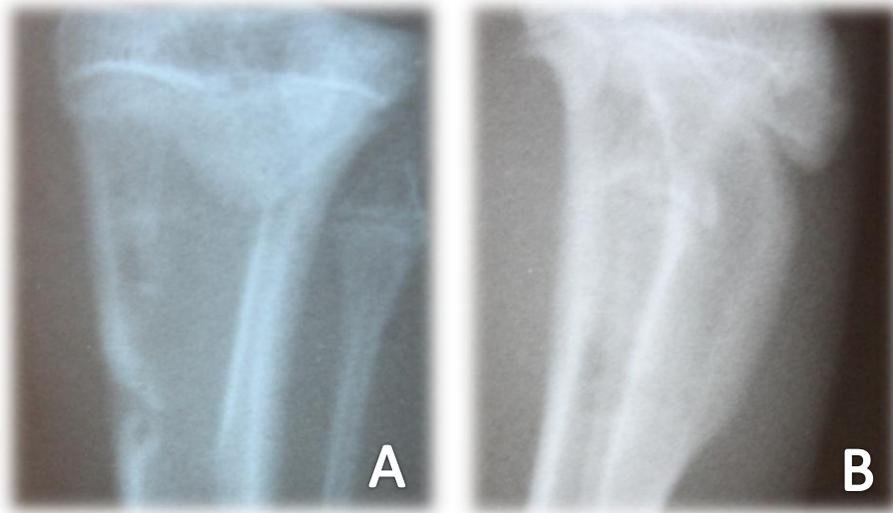


Imagen 13. Evaluación radiológica postquirúrgica, control semana 4, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente, en la toma (A) solo se puede observar una depresión en la cortical que obedece a uno de los defectos mientras que en la toma (B) se observa una respuesta perióstica sin poderse delimitar los defectos óseos.

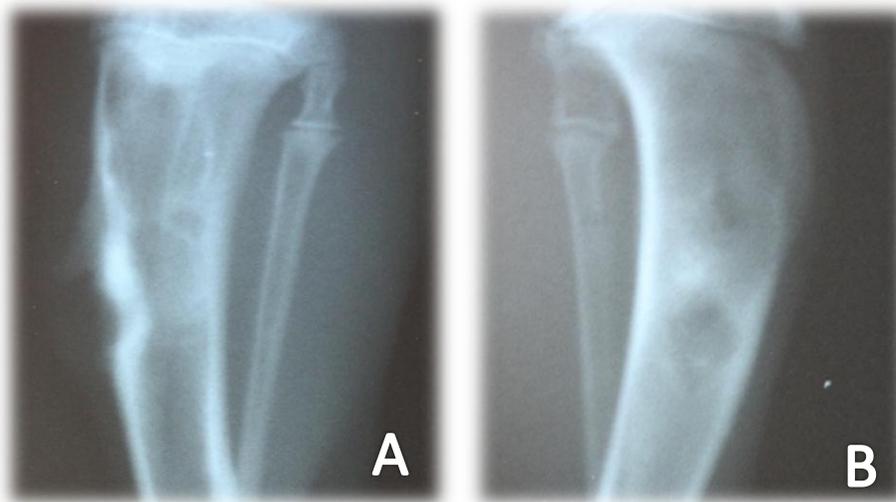


Imagen 14. Evaluación radiológica postquirúrgica, experimental semana 4, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente, se observan dos ligeras depresiones en la toma (A) correspondientes a los defectos óseos y se detecta un aumento de radiopacidad sobre la cortical; en la imagen (B) se aprecia poca diferencia entre las corticales sanas y las áreas de los defectos lo que indica la presencia de material en estos últimos.

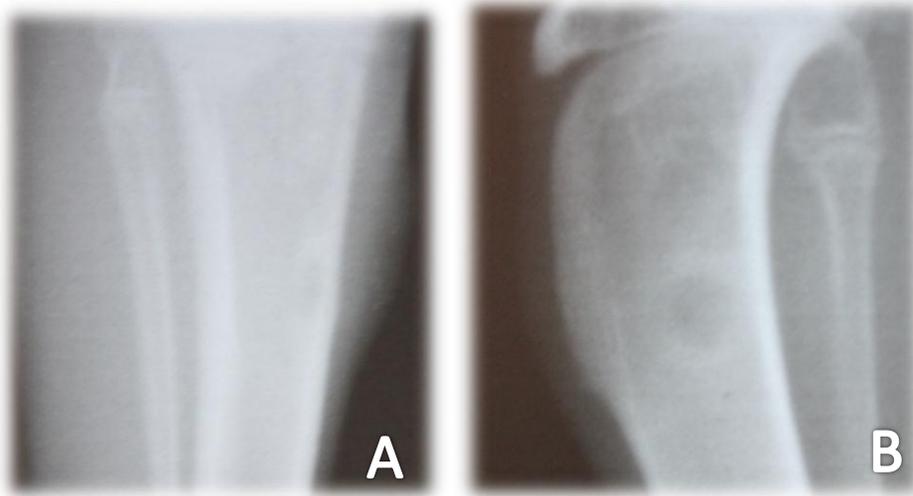


Imagen 15. Evaluación radiológica postquirúrgica, control semana 5, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente, en la toma (A) se observa una cortical sana sin cambios en las áreas del defecto y que corresponde a una reparación ósea.

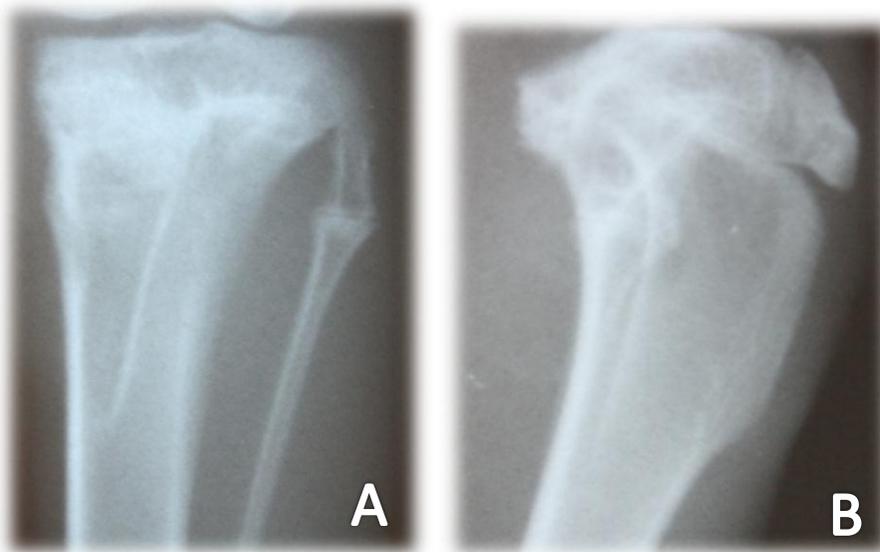


Imagen 16. Evaluación radiológica postquirúrgica, experimental semana 5, toma cráneo-caudal (A) y medio-lateral (B) respectivamente, se puede observar que ya no se distinguen los defectos óseos lo que indica que ha habido una reparación completa con su mineralización.

V.4. Evaluación histológica

Microscópicamente se observó la presencia del quitosán en las osteotomías de todas las laminillas de las 3, 4 y 5 semanas postratamiento.



Imagen 17. Cortes histológicos tinción H-E de hueso en grupos experimentales a las 3 (A), 4 (B), 5 (C) semanas, respectivamente, se observa en la imagen (A) el material dentro del hueso teñido de color rosa intenso, en la imagen (B) se observa un encapsulamiento del material en la zona del defecto con características de tipo granulomatosa y respuesta perióstica, en la imagen (C) se denota un encapsulamiento total del material sin integración de este. 4X, semanas tres, cuatro y cinco respectivamente.

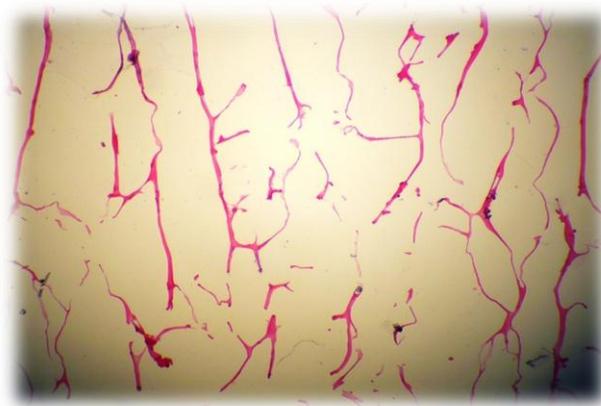


Imagen 18. Imagen microscópica de la esponja de quitosán teñida con H.E. Se observa la estructura en forma de trama teñida de rosa intenso, por la apetencia acidófila.

A las tres semanas pos tratamiento (PT) el biomaterial se observó rodeado de una cápsula en formación, con una estructura de colágena ya distinguible, con células de tipo fibroblasto y fibrocito. La trama del biomaterial fuertemente acidófila, presentó escasos eritrocitos y un fuerte infiltrado de neutrófilos, particularmente en la periferia, entre el quitosán (Q) y la cápsula fibrosa en formación (TF). La mayor parte de estas células infiltradas se presentaron ya con cambios degenerativos, necróticos y pocas células se distinguen con morfología característica en la periferia del material (IN). Entre las células infiltradas también se observaron mononucleares particularmente macrófagos (MQ), y una cantidad reducida pero evidente de eosinófilos (EO), por estas características la respuesta inflamatoria a la presencia del quitosán se considera de tipo supurativa. Por fuera de la cápsula, se observó la presencia de hueso de neoformación (HN), caracterizado por espacios lagunares bien vascularizados, revestidos de células de tipo osteoblasto.

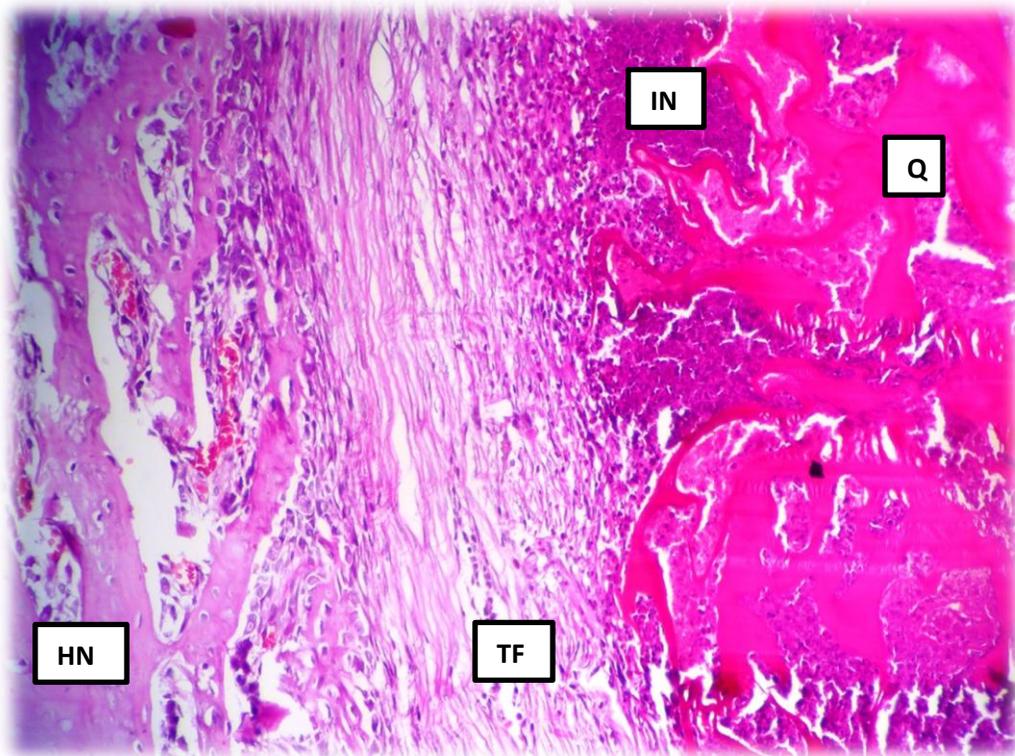


Imagen 19. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 3 semanas: Hueso de neoformación (HN), cápsula de tejido fibroso (TF), quitosán (Q), infiltrado necrótico (IN).

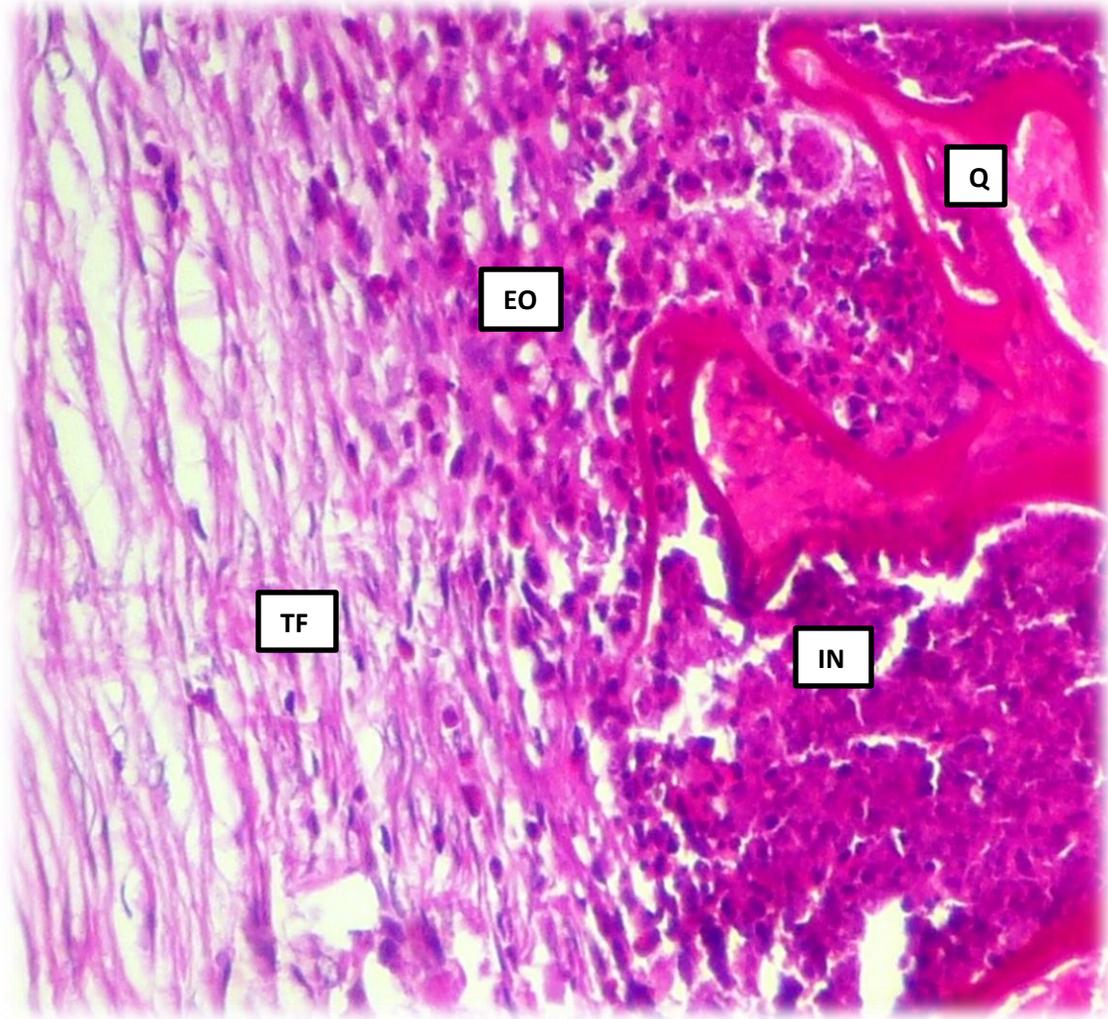


Imagen 20. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 3 semanas: capsula de tejido fibroso (TF), quitosán (Q), infiltrado necrótico (IN), Eosinófilos (EO).

A las cuatro semanas PT, el hueso de neo formación que rodea al quitosán encapsulado, se presenta más compacto, la cápsula se observa con material fibroso más denso y grueso, más ancho. El infiltrado se compone ahora de una mayor cantidad de detritos celulares, células en picnosis y material necrótico, los mononucleares (macrófagos) y polimorfonucleares (neutrófilos) son ahora menos aparentes y en contraparte es más importante la cantidad relativa de eosinófilos dentro del material y de la cápsula.

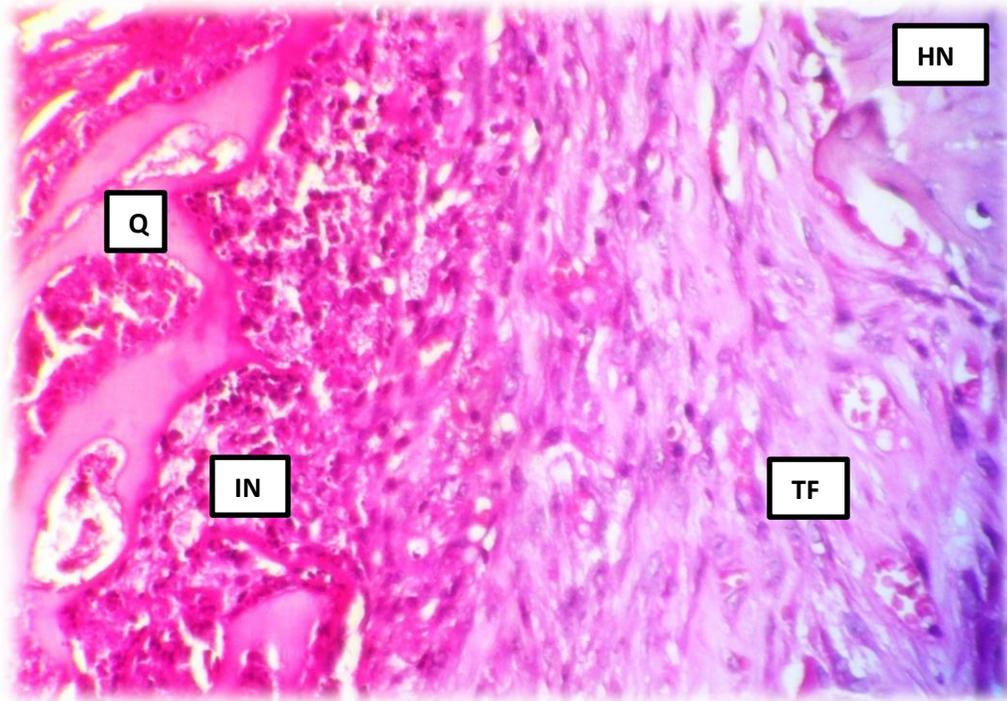


Imagen 21. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 4 semanas: capsula de tejido fibroso (TF), quitosán (Q), infiltrado necrótico (IN), hueso en neo formación (HN).

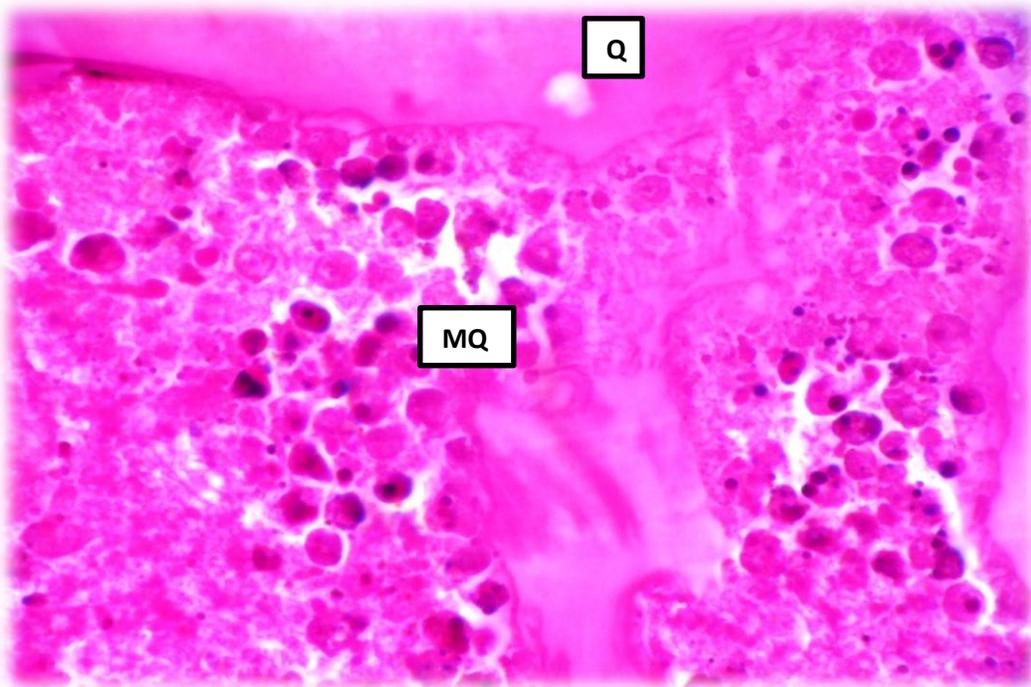


Imagen 22. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 4 semanas: quitosán (Q), macrófagos (MQ).

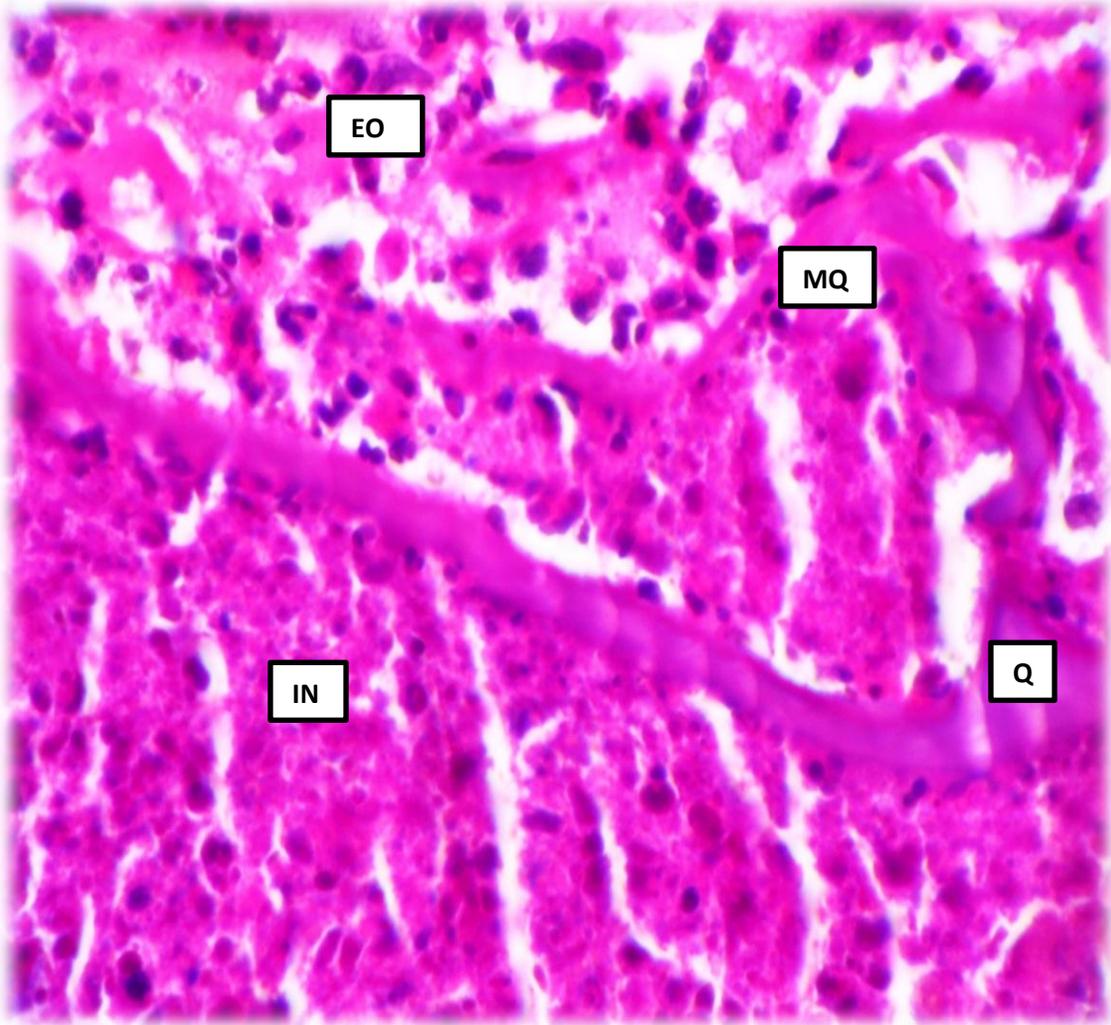


Imagen 23. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 4 semanas: quitosán (Q), macrófagos (MQ), eosinófilos (EO), infiltrado necrótico (IN).

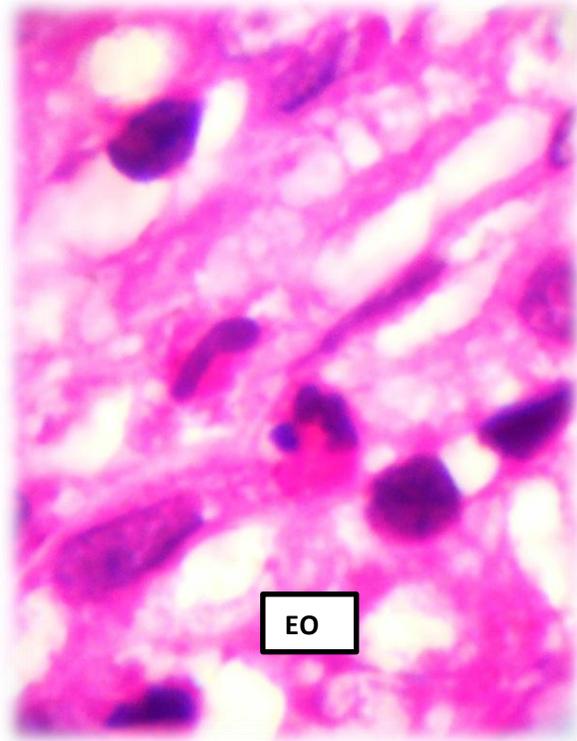


Imagen 24. Tinción H-E 100X. Tibia experimental a las 4 semanas: eosinófilos (EO).

A las cinco semanas, el hueso de neo formación es más compacto y los espacios presentan menor cantidad de osteoblastos, la neovascularización sigue siendo notoria. La cápsula que rodea todo el biomaterial es densa y más ancha. Entre ella y cerca, y dentro del biomaterial, la presencia de eosinófilos es más notoria aún, que en la cuarta semana. Las células mononucleares (macrófagos), continúan estando presentes en contraparte con los neutrófilos que son poco relativos. La trama del biomaterial se observa más delgada y los espacios entre ella se presentan ampliados y con notoria presencia de mononucleares (macrófagos).

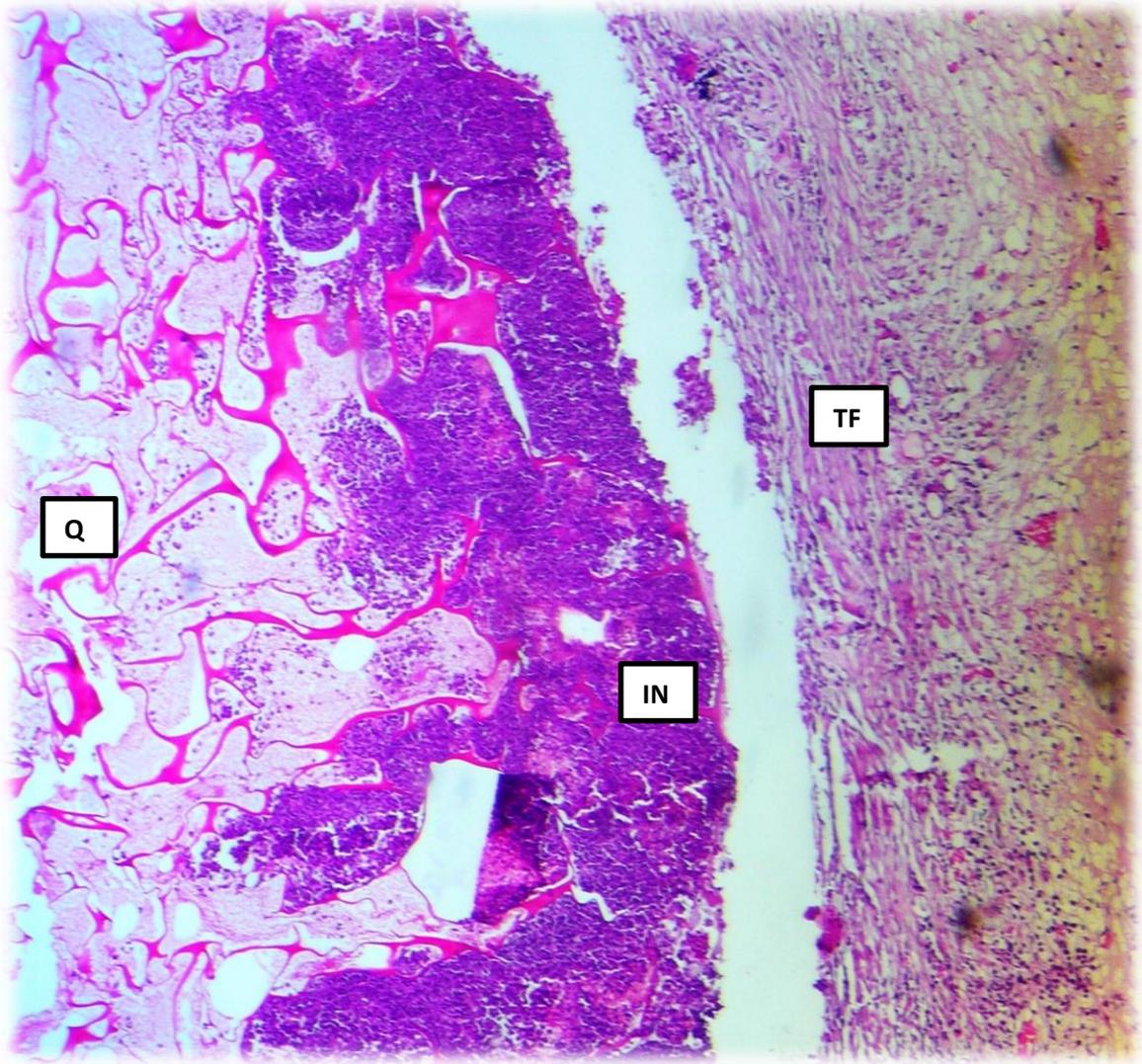


Imagen 25. Tinción H-E 10X. Tibia experimental a las 5 semanas: quitosán (Q), infiltrado necrótico (IN), cápsula de tejido fibroso (TF).

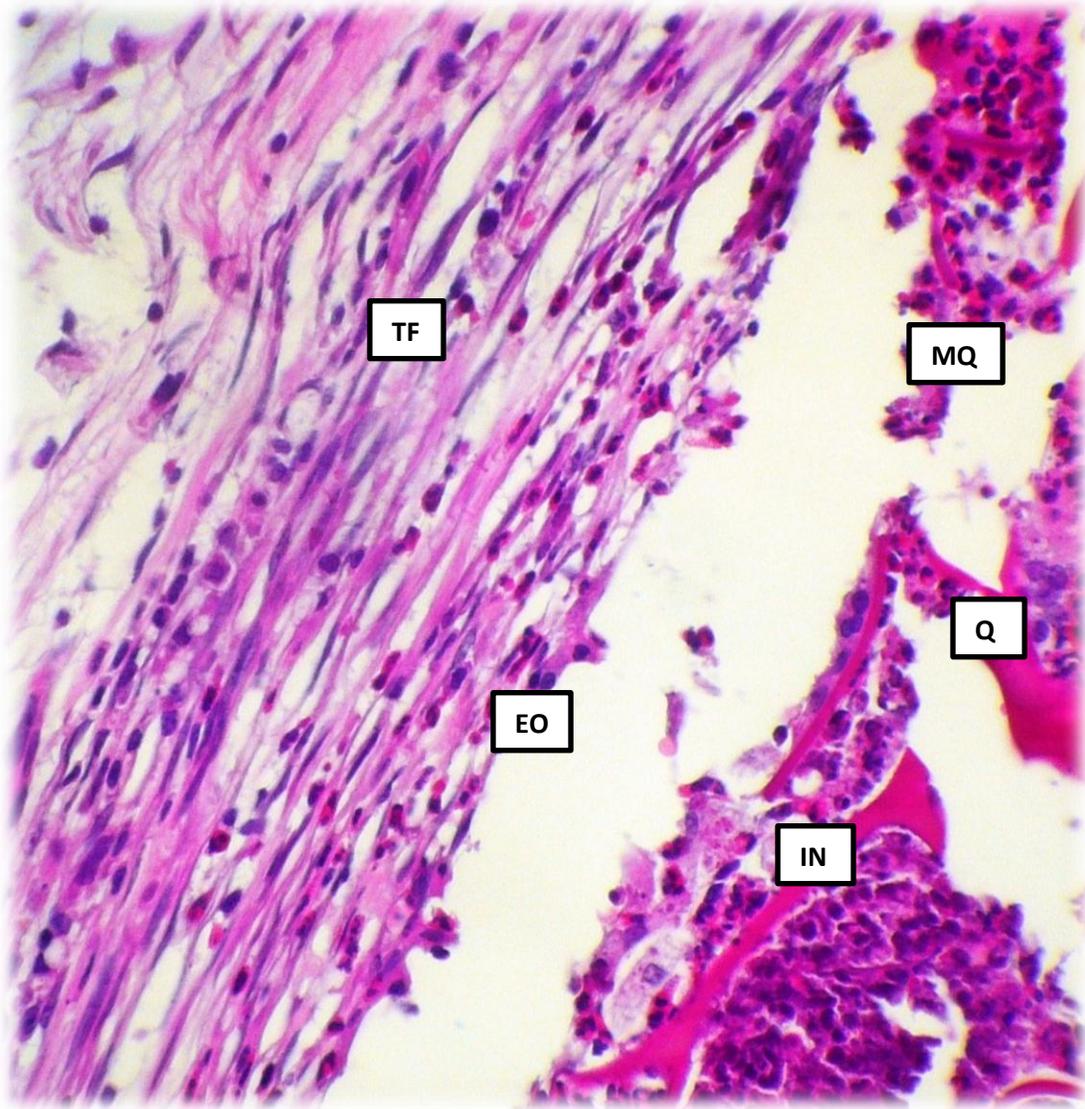


Imagen 26. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 5 semanas: quitosán (Q), cápsula de tejido fibroso (TF), macrófagos (MQ), eosinófilos (EO), infiltrado necrótico (IN).

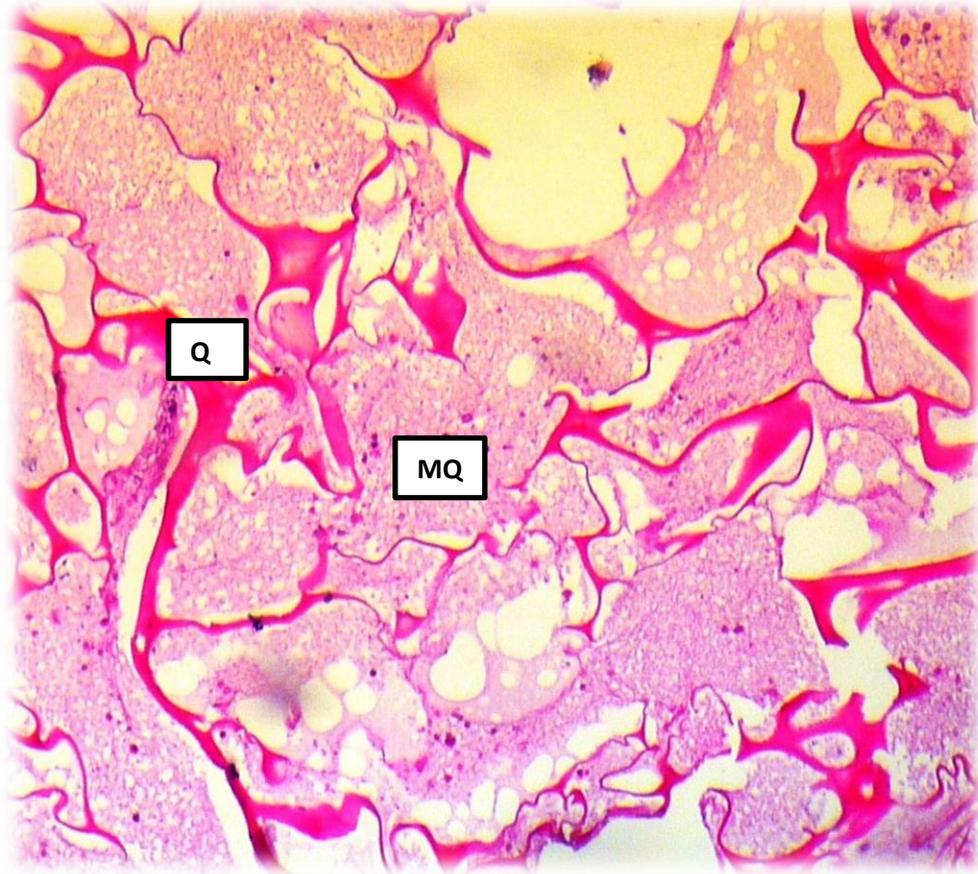


Imagen 27. Tinción H-E 40X. Tibia experimental a las 5 semanas: quitosán (Q), macrófagos (MQ).

A las tres semanas en las tibias control, sin aplicación de quitosán, las zonas donde se removió el hueso presentan actividad “cicatrizal”, con formación de tejido cartilaginoso en la zona del defecto, así como con presencia de tejido conectivo fibroso. Se delimita un área de neo formación de hueso, con abundante irrigación, la zona de defecto se encuentra ocupada casi en su totalidad por estos tejidos de nueva formación.

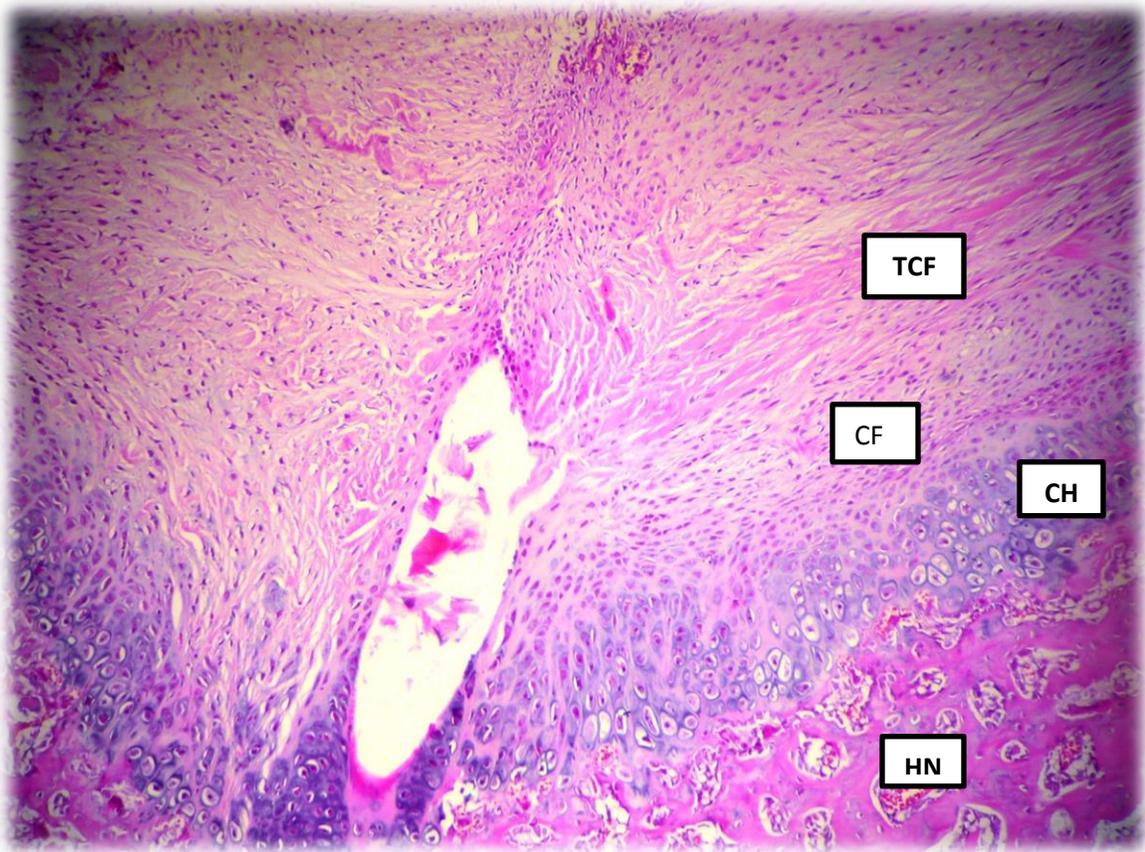


Imagen 28. Tinción H-E 40X. Tibia control a las 3 semanas: tejido conectivo fibroso (TCF), cartílago hialino (CH), cartílago fibroso (CF), hueso en neoformación.

A las cuatro semanas en las tibias control, se observa en la zona del defecto gran cantidad de hueso de neo formación, con espacios, vasos sanguíneos y osteoblastos, y persiste la presencia de tejido cartilaginoso hialino entre el hueso en neoformación, tejido fibroso de tipo cicatrizal, por fuera del hueso neoformado.

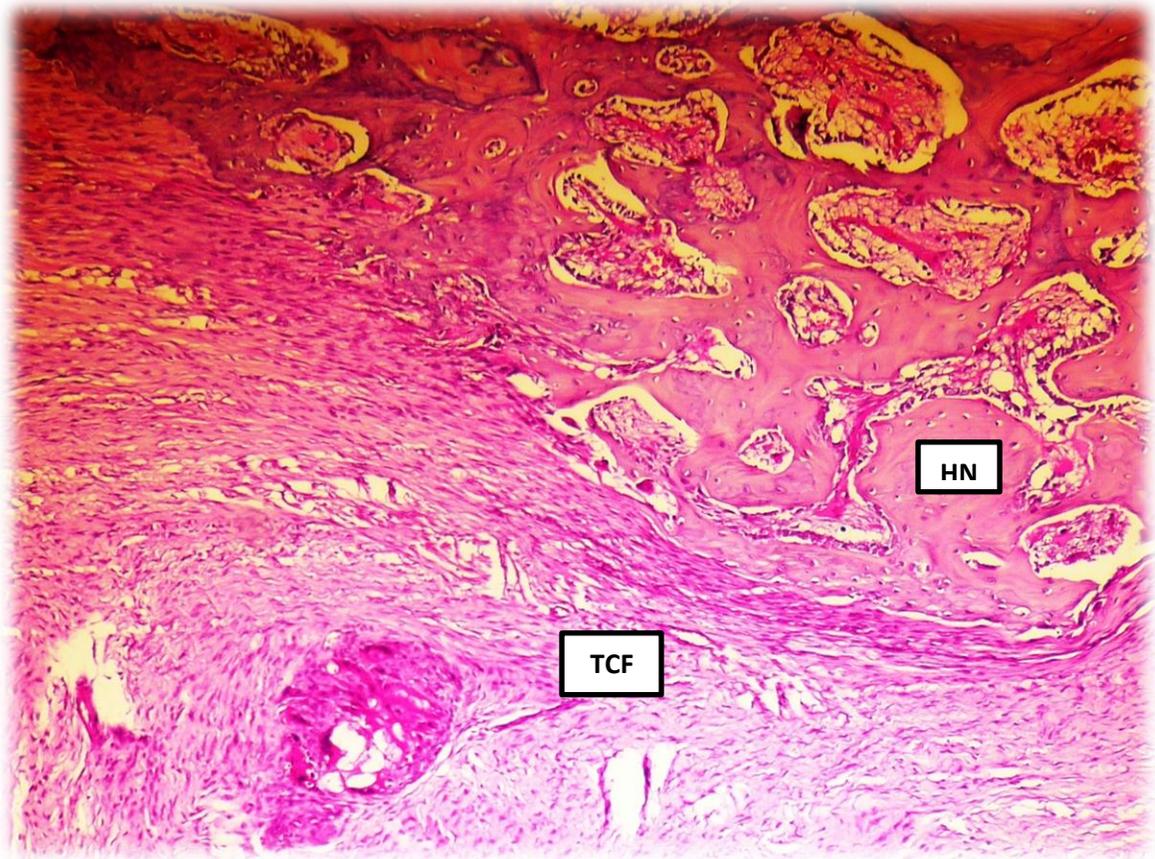


Imagen 29. Tinción H-E 40X. Tibia control a las 4 semanas: tejido conectivo fibroso (TCF), hueso en neoformación (HN).

A las cinco semanas en los controles se observa la zona del defecto reducida con tejido fibroso de tipo cicatrizal, hueso de neo formación con espacios reducidos y gran cantidad de osteocitos y vasos sanguíneos.



Imagen 30. H-E 40X. Tibia control a las 5 semanas: tejido conectivo fibroso (TCF), hueso en neoformación.

VI. DISCUSIÓN

Actualmente la ciencia de los biomateriales desarrolla técnicas para sustitución de hueso utilizando andamios de diferente naturaleza, en este estudio se utilizó un polímero (quitosán), reportado con características deseables para la implantación y promoción de la reparación ósea, como lo informan algunos autores como Muzzarelli 2011, Chunmeng 2006, Senel 2004, en sus estudios indican su capacidad de ser biodegradable, de fácil accesibilidad, de bajo costo, y con características biológicas capaces de proporcionar un soporte estructural para la osteoconducción y osteoinducción.

Como se mencionó en los resultados, el defecto óseo realizado en las tibias de todos los animales del experimento no causó ningún problema para deambular, debido a que éste no produce inestabilidad ni dolor que impida hacerlo como en las osteotomías realizadas en tibias de conejos en el experimento de Ramírez 2009.

Si bien después de un procedimiento quirúrgico ortopédico, la presencia de un proceso inflamatorio que disminuye conforme el tiempo pasa es considerando normal, y éste es consecuencia del daño tisular ocasionado, en nuestro trabajo se pudo observar en todos los animales del experimento, a través, de la evaluación del diámetro de la zona de la cirugía en ambos miembros, cráneo-caudal y medio-lateral siendo principalmente en éste último ya que corresponde a la cara medial de la tibia, zona donde se realizaron los defectos óseos y en los experimentales la aplicación de las esponjas del quitosán.

Es importante mencionar que al realizar el análisis entre los grupos controles y los tratados se pudo observar que al parecer la presencia del quitosán pudiera de alguna forma disminuir la inflamación, es decir tener un efecto antiinflamatorio, sin embargo, los informes de Hiroshi 2001 muestran que el quitosán es capaz de activar polimorfonucleares.

En la evaluación de laboratorio, los animales de experimentación mostraron una baja del hematocrito postoperatoria en comparación con los prequirúrgicos, sin embargo, ambos se mantienen dentro de los parámetros normales de referencia, lo que podría deberse a una anemia postquirúrgica transitoria como lo propone Duncan 2005.

Por otro lado el aumento del conteo leucocitario encontrado durante el prequirúrgico puede obedecer a una situación de estrés, al cual estuvieron sometidos los animales durante la recolección de la muestra tal y como lo sugiere Duncan 2005; mientras el incremento encontrado durante el posoperatorio y que si rebasa los parámetros normales se debe principalmente a un proceso de respuesta postquirúrgico como lo indica Duncan 2005, ya que no se presentaron indicios de infección posquirúrgica.

Normalmente durante las lesiones de los tejidos ocurre un incremento en la demanda de neutrófilos, linfocito T, macrófagos y células estromales que se activan y liberan factores de crecimiento, como los factores estimulantes de colonias, de células madre, de granulocitos y de granulocitos/macrófagos; así como citocinas y linfoquinas Duncan 2005; lo anterior puede justificar el incremento de los linfocitos y neutrófilos durante el estado posquirúrgico que presentaron los animales en experimentación, en comparación con los resultados obtenidos en el prequirúrgico.

Finalmente y como uno de los datos más sobresalientes en los resultados de las células sanguíneas, fue el exacerbado incremento de los eosinófilos. Una de las funciones más importantes de estas células es la participación en la supresión de reacciones de hipersensibilidad; son atraídos por mediadores químicos liberados por los mastocitos y los inhiben durante reacciones alérgicas y anafilácticas Duncan 2005. Martínez 1998 en un estudio experimental, en ratones, evaluó la actividad sobre el sistema inmune que tiene el quitosán y la *FESCdipina*, encontró que en las pruebas hematológicas realizadas existe un aumento significativo en el número de eosinófilos después de la administración del quitosán, estas células son capaces de moverse y fagocitar, siendo ésta la causa del aumento de los eosinófilos, aunque también podemos suponer que este aumento se deba a que los productos desarrollen alguna especie de reacción alérgica pues también estas células se encuentran involucradas en este tipo de reacción.

La isoenzima fosfatasa alcalina sérica (FAS) puede encontrarse unida a la membrana plasmática de células de diferentes órganos. Puede observarse un aumento de la actividad isoenzima FAS en animales jóvenes, animales en crecimiento rápido, con lesiones de lisis o proliferación ósea o animales con resorción ósea activa Duncan 2005. El incremento paulatino de la FAS que se pudo observar durante nuestro trabajo en los resultados en los

grupos durante fase prequirúrgica, se puede deber a que se utilizaron animales jóvenes durante el experimento; mientras que el aumento observado después de la cirugía es muy sugestivo que sea una respuesta a la lesión y reparación del defecto óseo realizado en la tibia como lo indica Gartner 2002. Albarova 2002 durante su experimento al probar nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea en conejos y evaluar a través de determinaciones analíticas de la FAS en sangre periférica, reporta que los valores están presentaron oscilaciones variables entre animales y entre grupos, sin seguir ningún patrón característico.

Los signos radiográficos más importantes que se deben considerar en defectos y reparación ósea son la densidad, forma, tamaño, contorno y arquitectura. La densidad es probablemente el más importante, misma que puede estar disminuida o aumentada y ser localizada o generalizada como lo refiere Santoscoy 2008.

Entre más claro y definido sea el margen de la lesión, es más probable que sea de naturaleza benigna; así mismo, se expanden lentamente y presentan cambios leves de un estudio a otro. Usualmente la respuesta periostial, la zona de transición, el margen de la lesión y el índice de expansión, se consideran en conjunto en un esfuerzo por establecer la naturaleza benigna de una lesión ósea indicado por Méndez 2005.

La formación de hueso nuevo periostial normalmente se puede apreciar después de los 7 – 10 días, y se puede reconocer radiológicamente, sobre todo en animales jóvenes, lo nos ayuda a realizar diagnósticos diferenciales sobre la gravedad y desarrollo de la reparación. Existen diferentes factores que pueden modificar ésta respuesta, principalmente los relacionados con la inflamación (Ruth 2010).

La respuesta perióstica que se pudo apreciar a partir de la segunda semana y que se comportó en constante incremento, nos permite suponer que en ambos grupos se mantuvo una constante reparación ósea, sin embargo, la respuesta del grupo experimental fue más evidente, lo que nos permite pensar que se debe a la presencia del quitosán, es decir que la presencia de éste material podría tener un efecto proinflamatorio.

La densidad ósea en nuestro trabajo se consideró principalmente en la zona del defecto y se evaluó como presencia de material en la osteotomía realizada quirúrgicamente. En las placas radiográficas se puede observar una disminución de la densidad con una morfología redondeada de bordes regulares y lisos que permiten diferenciarlos perfectamente del hueso normal. La imagen radiológica muestra la discontinuidad del hueso cortical, con la comunicación entre el exterior y la zona medular del hueso, esto concuerda con los resultados de Ramírez 2009. En el grupo control durante las dos primeras semanas no hubo cambios de la ésta densidad, sin embargo, los defectos comienzan a cambiar su forma y no fue hasta la tercera semana que se pudo apreciar un incremento considerable de la densidad, perdiéndose la imagen del defecto; Ramírez et al 2009 en sus grupos controles a las 4 semanas observa los bordes de los defectos óseos menos nítidos pero con bordes regulares y lisos, y en la imagen radiológica transversal pudo observar el cierre completo de la cortical, aunque su grosor y densidad todavía eran diferentes a las del hueso circundante. Por otro lado las características radiológicas del material implantado corresponde a la que se observó a partir de la segunda semana en el grupo experimental y que se mantuvo permanente durante las tres primeras semanas, mismo que concuerda con los resultados obtenidos por Ramírez 2009, pero trabajaron con materiales (Endobon, hueso autólogo , melantonina) diferentes al nuestro.

En nuestro trabajo, la evaluación histológica mostró la presencia en las zonas del defecto de una variable y determinada celularidad en los diferentes grupos y en las diferentes semanas que duró el experimento.

Durante las cinco semanas, el grupo control se caracterizó por presentar un patrón de células exclusivas de una típica reparación ósea, que inició a la tercera semana con la presencia de tejido conectivo fibroso, formación de tejido cartilaginoso, con una abundante irrigación; mientras que en la cuarta semana la presencia de una gran cantidad de hueso de nueva formación, osteoblastos y una vasta irrigación la caracterizó; finalmente a las cinco semanas la reducción de espacios en la zona del defecto y una cantidad de osteocitos y vasos sanguíneos representan que la reparación está llegando a su término; estos resultados coinciden con los obtenidos por Ramirez 2009.

A las tres semanas en los grupos experimentales, la asistencia de un infiltrado neutrofílico, acompañado por fibroblastos y fibrocitos alrededor del material implantado y la iniciación de una cápsula fibrosa y cambios degenerativos, necróticos, así como la infiltración de macrófagos y una cierta presencia de eosinófilos, sugieren un estado de inflamación a la presencia de quitosán de tipo supurativa. Xiaohong 2002 dentro de su trabajo sobre la reparación de radio y tibias de conejos con implantes de quitosán fosforilado reforzado con cemento de fosfato de calcio, siguiendo un modelo parecido a nuestro trabajo pudo observar a las cuatro semanas un proceso hemorrágico alrededor del implante y tejido de granulación acompañado de gran cantidad de macrófagos y células gigantes, así como un proceso moderado de inflamación. Es importante considerar que el quitosán tiene un efecto estimulador sobre los macrófagos y un efecto quimiotáctico sobre los neutrófilos como lo menciona Muzzarelli 2009. Algunos otros autores al evaluar los efectos del quitosán, como Chunmeng 2006, asegura que el quitosán y la quitina son quimiotácticos para neutrófilos tanto *in vitro* como *in vivo* y Senel 2004, Hiroshi 2001, Muzzarelli 2009, quienes de igual manera mencionan que este biopolímero recluta células inflamatorias. Estos autores también mencionan que el quitosán induce la producción de fibroblastos. Es importante señalar que también a las tres semanas se pudo observar una respuesta osteogénica, dada por los espacios lagunares vascularizados revestidos de osteoblastos alrededor del encapsulamiento del quitosán.

Hiroshi 2001 menciona que el quitosán acelera la producción de mediadores biológicos ya que los macrófagos activados migran a zonas heridas, a la estimulación. Estos macrófagos sintetizan factores de crecimiento que influyen en la cicatrización de heridas. El quitosán es un polisacárido, que puede producir citocinas, que pueden promover la reparación de los tejidos; los efectos del quitosán en los macrófagos se explican ya que el quitosán se compone de GlcN y GlcNAc. Los macrófagos parecen expresar los receptores de manosa-GlcNAc y glicoproteínas, que median la absorción de las glicoproteínas como en los macrófagos. La unión de GlcNAc a los receptores específicos se piensa que es un requisito previo para mejorar la activación de los macrófagos. Los macrófagos juegan un papel importante en el proceso de cicatrización de la herida. La activación de los

macrófagos conduce a la liberación de diversos mediadores biológicos y la fagocitosis de los cuerpos extraños, como ocurrió en la semana 5 de nuestro trabajo donde se encontró la presencia de macrófagos y una disminución de las tramas del material.

Las características histológicas encontradas a las cuatro semanas, como la presencia de material necrótico y células en picnosis, así como la disminución de macrófagos y neutrófilos, y un aumento de eosinófilos dentro y fuera del material implantado, nos permite suponer que nos enfrentamos a un proceso inflamatorio de tipo alérgico localizado; características muy parecidas encontradas por Xiaohong 2002 en su experimento a las cuatro semanas, sin embargo, éste autor trabajo con quitosán más un cemento de fosfato de calcio.

Durante la quinta semana se aprecia la evidencia de osteogénesis por la periferia del material encapsulado y se mantiene una celularidad característica de una inflamación alérgica, sin embargo, disminuyen los neutrófilos y la cápsula que rodea al biomaterial está más densa y ancha lo que sugiere la cronicidad. Lo anterior nos permite resaltar que la presencia del material puro mantiene el efecto inflamatorio, probablemente se deba a su acidez (pH 5.5). Ya que al revisar otros trabajos y en los cuales el pH del quitosán es modificado, es bufferado a alcalino y no se muestra éste efecto como lo indica Senel 2004, Hiroshi 2001, Muzzarelli 2009, Chunmeng 2006.

Todos estos estudios tienen en común un factor determinante que fue el pH del quitosán el cual siempre se bufferaba a niveles neutrales y variaba entre 7.2 y 7.4. En nuestro estudio utilizamos un quitosán con pH muy bajo (5.5), el cual podría haber sido la causa del encapsulamiento por provocar una respuesta irritativa en el hueso, el ambiente ácido asociado con su degradación y su rigidez relativamente pobre, puede causar graves reacciones inflamatorias *in vivo* según Eun 2008.

Hiroshi 2001 informó que el quitosán estimula la producción de interleucina (IL) -1 por los macrófagos. La proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno se efectúan tanto positiva como negativamente por la IL-1, así como por la IL-6 y TNF- α . A partir de estas descripciones, los macrófagos estimulados con quitosán pueden producir otros factores de crecimiento que tiene efectos positivos en la producción de ECM.

El análisis anterior nos permite proponer que el quitosán por sí solo no permitió la evolución de la osteogénesis, sin embargo, su presencia irritativa inflamatoria, pudo de alguna forma estimular al periostio y por ende la diferenciación y reclutamiento de los osteoblastos. El quitosán por sí mismo no es suficiente para inducir la regeneración rápida de hueso en el estado inicial de la cicatrización ósea. Se sugiere que éste podría ser utilizado como material de base para el dispositivo de andamios y como herramienta en la mejora de la eficacia de regeneración de tejidos propuesto por Jue 2002.

Las investigaciones relacionadas con regeneración ósea utilizando quitosán mencionan que han adicionado diferentes compuestos a este tales como factores de crecimiento, dexametasona, colágena, silica, fosfatos, hidroxiapatita etc, y en los cuales se ha demostrado la eficacia de éste como andamio teniendo resultados efectivos en la regeneración ósea.

Abarrategui en sus trabajos confiere al quitosán propiedades osteoinductivas. Sin embargo, en la regeneración de tejido óseo, el quitosán se ha utilizado principalmente para la formación de materiales con fosfatos cálcicos e hidroxiapatita. Estos sistemas incorporan propiedades de los dos componentes. Por un lado, los fosfatos cálcicos proporcionan refuerzo a la matriz y osteoconductividad y por otro, el quitosán modula la degradación y las propiedades mecánicas. Estos compuestos se integran rápidamente en la estructura ósea y son transformados finalmente en hueso.

La incorporación del sustituto óseo es un proceso secuencial que comienza con la inflamación y atraviesa por diferentes estadios de revascularización, hasta conseguir una estructura mecánica adecuada sin olvidar que el requisito fundamental en un injerto es su capacidad de formar ó ser substituido por hueso sin ser rechazado por el receptor así como lo indica Álvarez 2002. Pavan 2010 nos señala que el material que induzca una respuesta biológica específica en el tejido vivo, formando una unión entre el tejido y el material implantado (osteointegración), sin la intervención de una capa de tejido fibroso se denomina bioactivo. Sin embargo en nuestro estudio el análisis histológico demostró el encapsulamiento del quitosán, por una capa de tejido fibroso desde la semana 3 hasta la semana 5 siendo esta cada vez más densa.

VII. CONCLUSIONES

En base a la discusión realizada de nuestro trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. El quitosán implantado en los defectos óseos realizados en las tibias de los conejos No se integró satisfactoriamente, siendo encapsulado.
2. La acidez de los materiales para sustitutos óseos, puede ser un factor no deseado para su integración.
3. La presencia del quitosán dentro de los defectos óseos es capaz de desarrollar una respuesta inflamatoria supurativa.
4. El uso del quitosán puro no puede ser utilizado como sustituto óseo en defectos en modelos de conejos, por lo tanto no es recomendable hacerlo.
5. Nuestro trabajo marca la pauta para la realización de otros trabajos de investigación con éste material combinándolo con otros materiales, para ser utilizados como sustitutos de hueso.
6. El modelo animal trabajado con conejos es un excelente modelo para estudios de huesos.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Trigo, T. F. ***“Patología sistémica veterinaria”***, 3° ed. Ed. McGraw-Hill, México, 1998.
2. Junqueira, L. C., ***“Histología básica: texto y atlas”***, 6° ed. Ed. Masson, Barcelona, 2005.
3. Ross, M. H., ***“Histología texto y atlas color con biología celular y molecular”***, 5° ed. Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires, 2005.
4. Stevens, A. ***“Histología humana”*** 3° ed. Ed. Elsevier, España, Madrid 2006.
5. Gartner L.P., ***“Texto atlas de histología”***, 2° ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, D.F. 2002.
6. Fawcett, D.W., ***“Compendio de Histología”***. Ed McGraw-Hill-Interamericana, España Madrid 1999.
7. Young, B. ***“Histología funcional texto y atlas en color”***, 3° ed. Ed. Elsevier, España, Madrid 2004.
8. Almazàn, D.A., De la Cruz, G.J., Lira, R.J., et al. ***“Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: estudio radiológico, histológico, e histoquímico”***, Rev Mex Ortop Traum; 10 (3): May-Jun: 142-152. 1996.
9. Domínguez, A.A., Torres V. C., ***“Descripción histológica de la regeneración ósea en conejos implantados con hueso de bovino liofilizado (NUKBONE)”***, Universidad Simón Bolívar, Investigación Universitaria Multidisciplinaria año 5, No. 5, Diciembre, 2006.
10. Flores, G.E., ***“Cicatrización e integración de hueso desmineralizado en tibias de perros (canis familiaris) con osteotomías.”***, (Tesis de maestría), México, Cuautitlán, 2003.
11. Alvarova, J.G., Martínez, I.M., Clément J., et al ***“Desarrollo experimental de nuevos materiales biodegradables para la reparación ósea”***. Mapfre Medicina, Vol. 13 No. 4, 2002.
12. Ciénega, R.M., Lira R.J. Almanza, D.A., et al. ***“Uso de hidroxiapatita coralina HAP 200, como sustituto de injerto óseo en ortopedia”***, Rev Mex Ortop Traum 1998; 12(5): Sep-Oct: 410-415

13. Pavan M.P., Orivaldol C.G., Okamoto T., *et al.* “**Evaluación histomorfológica de compuesto óseo de ricinus granulado en la regeneración ósea en conejos**”, Programa Interunidades em bioengenharia, Universidad de Sao Paulo, 2010.
14. Hua, Y., Ning C., Xiaoying L., *et al* “**Experimental study of natural hidroxyapatite/ chitosan composite on reconstructing bone defects**” Journal of nanjing Medical University, Vol. 22, No 6, 2008.
15. Chunmeng, S., Ying Z., Xinze R., *et al* “**Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine**”, Journal of surgical research”, N. 133, 2006.
16. Bonete L.D., Gomar S.F., Carrasco L.J., “**Utilización de geles plaquetarios en la curación de los defectos óseos. Estudio experimental.**” Revista española de cirugía osteoarticular, No. 239, Vol. 46, Julio – Septiembre 2009
17. Álvarez, L.E., Ripalda, P., Forril F., “**Reparación e integración de los injertos en cirugía ortopédica**”, Rev Mex Ortop Traum 2002; 16(3): May-Jun: 173-180
18. Velasco, P.M, Garzon A.D., “**Implantes Scaffolds para regeneración ósea, materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión**”, *Investigación biomédica*” Vol. 29, No, 1 Ciudad Habana, 2010.
19. Muzzarelli R.A., “ **Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cell, for bone regeneration**” Carbohydrate polymers 83, 2011
20. Arpornmaeklong, P., Suwatwirote N., Pripatnanont P., *et al*, “**Growth and differentiation of muse osteoblasts on chitosan-collagen sponges**”, International Journal oral maxillofacial surgery, Vol. 36, 2007.
21. Yong, M.L., Yoon J.P., Si N.P., *et al*, “**Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration**”, Biomateriales 21, 2000.
22. Yoon J.P., Yong M.L.M, Ju Y.L., *et al*, “ **Controlled release of platelet- derived growth factor BB from chondrotin sulfate- chitosan sponge for guided bone regeneration**” Journal of controlled release 67, 2000.
23. Martinez M.M., Pacheco B.A., Vargas V.M., “**Evaluacion histologica de biocompatibilidad y bioconduccion del compuesto hidroxiapatita- lignina implantado en tibias de conejo**”, Rev MVZ Cordoba 14 (1), 2009.

24. Duque, M.C., Olate S., Gracias A.M. et al, "**Análisis histológico del proceso de reparación en defectos óseos. Reconocimiento de defectos críticos**", International Journal of Morphology, Vol. 27, N. 4, 2009.
25. Miranda C.S.P., "**Evaluación de la actividad antibacteriana de quitosán, caracterizado física y químicamente**" (tesis de Maestría), México, UNAM, 1999.
26. Lárez V.C., "**Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro**" Avances en química, 1(2), 15-21, 2006.
27. Barrientos R.S., "**Quitosán: aplicaciones y aspectos económicos**" (tesis de licenciatura), México, UNAM, 1999.
28. Senel S., McClure S.J., "**Potential applications of chitosan in veterinary medicine**", *Advanced drug delivery reviews*, Vol. 56, 2004.
29. Garcia A.H., "**Pruebas de actividad antibacteriana de quitosán**" (tesis de licenciatura), México, UNAM, 1999.
30. Lemus, C.J., Martínez Z.L., Navarro M., et al "**Obtención y uso de quitosán para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón**", Boletín electrónico N. 7, Facultad de Ingeniería, Universidad, 2007.
31. Garcia G.E., "**Caracterización del quitosán como excipiente de compression directa**" (tesis de licenciatura), Mexico, UNAM, 1998.
32. Cruz C.C., "**Evaluación del efecto conservador y antimicótico de la película de quitosán en la vida útil del mango (*mangifera L. indica*) variedad haden**" (tesis de licenciatura), México, UNAM, 1999.
33. Guzman, M.J., El G.H., Pham M., et al, "**Effect of chitosan particules and dexamethasone on human bone marrow stromal cell osteogenesis and angiogenic factor secretion**", *Bone* 45, 2009.
34. Abarrategui, L.A., "**Estudio del quitosán como biomaterial portador de Rbmp-2: desarrollo caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo**" (tesis de doctorado), Madrid 2008.
35. Hiroshi, U., Takashi M., Toru F., "**Topical formulations and wound healing applications of chitosan**", *Advanced drug delivery reviews*, 52, 2001.
36. Muzzarelli R. "**Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone**", *Carbohydrate Polymers* 76, 2009.

37. Jue Y.L., Sung H.N., Su Y.I., et al, "***Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan- based biomaterials***", Journal of controlled release Vol. 78, 2002.
38. De Corral E.A., Mesa A.F., Freiherr V.F., et al, "***El maxilar inferior del orden lagomorpha como material de investigación en implantología experimental***" Avances en periodoncia, Vol. 14 (2), 2002
39. Amillo S., González F., Illescas J., "***Incorporación de aloinjertos óseos intercalares corticales. Estudio experimental en conejos***", An Sist. Sanit Navar, Vol. 26 N.3, 2003.
40. León M.B., "***Manual de manejo y anestesia en el conejo como modelo quirúrgico en docencia***", 2da edición, Facultad de medicina, UNAM, México, 2006.
41. Duncan R.J, "***Patología Clínica Veterinaria***", 4°ed, Ed. Multimedica, España 2005.
42. Ham C.D., "***Tratado de Histología***", Ed. Interamericana, México, 1970.
43. Thrall D.E., "***Tratado de diagnóstico Radiológico Veterinario***", 5°ed, Ed. Interamericana, Buenos Aires Argentina, 2009.
44. Lax P.A., Vicente O.V., Mesenguer L., et al, "***Implante óseo de la espuma de hidroxiapatita-09 estudio experimental en conejos***", Revista Esp de Patología, Vol. 38, N. 1, 2005.
45. Ramírez F.P., Vicente O.V., Calvo G.J., et al, "***Modelo experimental de la respuesta ósea a implantes y melatonina: estudio radiológico e histomorfométrico***", Congreso virtual hispanoamericano de anatomía patológico", N. 1909 Facultad de Medicina y odontología, Murcia, España, 2009.
46. Zarate K.B., Reyes S.A., "***Injertos óseos en cirugía ortopédica***", Red de revistas científicas de América latina", Vol. 74, N. 3, México D.F., UAM 2006.
47. Xiaohong W., Jianbiao M., Yinong W., et al, "***Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements***", Biomateriales 23, 2002.

48. Eun J.L., Du S.S., Hyoun E.K., et al, "***Membrane of hybrid chitosan – silica xerogel for guided bone regeneration***", Biomateriales 30, 2009.
49. Martinez A.G., "***Evaluacion de la actividad sobre el sistema immune tiene el quitosán y la FESCdipina comparada con la actividad inmunoestimulante BCG (Bacillus Calmette Guerin)***", (Tesis de licenciatura), México, 1998.
50. Santoscoy M.E., "***Ortopedia neurologia y rehabilitación en pequeñas especies***", Manual Moderno, México D.F. 2008.
51. Dennis R., "***Handbook of small animal radiology and ultrasound***", Elsevier, Toronto 2010.
52. Aguilar B.J., "***Métodos y técnicas de diagnóstico***" Diplomado a distancia en medicina veterinaria y zootecnia, Modulo 1, UNAM 2005
53. Camacho L., "***Apuntes inflamacion cronica y aguda***", Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM, 2005.