



**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MATRICES EXTRACELULARES
ARTIFICIALES PARA REGENERACIÓN ÓSEA**

***DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ARTIFICIAL
EXTRACELLULAR MATRICES FOR BONE REGENERATION***

CARLOS HUMBERTO VALENCIA LLANO

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

VALLE DEL CAUCA, SANTIAGO DE CALI

2016



DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MATRICES EXTRACELULARES
ARTIFICIALES PARA REGENERACIÓN ÓSEA

*DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF ARTIFICIAL EXTRACELLULAR
MATRICES FOR BONE REGENERATION*

CARLOS HUMBERTO VALENCIA LLANO

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TESIS DOCTORAL

HÉCTOR FABIO ZULUAGA, PhD (DIRECTOR)

MARIO ALEJANDRO ORTIZ, MSc (CODIRECTOR)

VALLE DEL CAUCA, SANTIAGO DE CALI

2016

PÁGINA DE ACEPTACIÓN

JURADO 1

ACEPTO _____

JURADO 2

ACEPTO _____

Ciudad y Fecha

"Cuando alguien desea realmente algo el universo entero conspira para que lo logre. Solo basta con aprender a escuchar los latidos del corazón y a descifrar un lenguaje que va más allá de las palabras, el que muestra lo que los ojos no pueden ver."

Paulo Coelho, El Alquimista

DEDICATORIA

A mi familia (a mi mama y a mis hermanos por su apoyo constante e incondicional) y muy especialmente a Linda, Laura y Ana, quienes sacrificaron demasiado.

Agradecimientos

Cuando se realiza un proyecto tan complejo como este son tantas las personas que participan y aportan al mismo que a veces es inevitable dejar de mencionar a alguno, espero que si ocurre puedan disculparme.

En primer lugar debo agradecer a los profesores Héctor Fabio Zuluaga y Mario Alejandro Ortiz quienes me regalaron cuatro años de sus vidas, a todos mis docentes del Doctorado en Ciencias biomédicas particularmente a las profesoras Lilita Salazar y Carolina Pustovrh.

A mis compañeros del Doctorado y Maestría en Ciencias Biomédicas, con especial cariño a Eleonora, Sonia, Esperanza y Dolly, compañeras de lucha y amigas incondicionales

A Martha Castellanos y Nhora Holguín, profesionales del Laboratorio de Histología y a los funcionarios del Bioterio de la Universidad del Valle Cirsa Hidalgo y José Israel Cartagena por su apoyo en el desarrollo de los experimentos.

Al Profesor Oscar Zuluaga y a Jaime Muñoz por su apoyo en el Laboratorio “In Vitro”

A José Hermínsul Mina y a sus estudiantes de Ingeniería de Materiales Carlos Hugo Vidal, Christian Roldan y Harry Maturana quienes elaboraron y caracterizaron las matrices sintéticas.

Al Ingeniero Irving Jadway Castro de la Universidad del Valle quien me apoyo con los análisis de Microscopía electrónica de Barrido.

Al profesor Luis Catalani quien me acogió en el Instituto de Química de la Universidad de Sao Paulo, a los estudiantes del posdoctorado de Química Diego Clemente y Alliny Naves por su apoyo durante la pasantía, así como al Ingeniero Alfredo Duarte por su ayuda con las caracterizaciones realizadas en el Instituto.

A los compañeros de los grupos de estudio TEBLAMI (Ciencias Básicas), SIMERQO (Química) y Materiales compuestos (Ingeniería de Materiales) por sus aportes y apoyo.

A la Universidad del Valle quien financió esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
 - 1.1 La Ingeniería de Tejidos óseos
 - 1.1.1 Las Estrategias de la Ingeniería de tejidos
 - 1.1.1.1 Estrategia basada en células
 - 1.1.1.2 Estrategia basada en factores de crecimiento y sustancias bioactivas
 - 1.1.1.3 Estrategia basada en andamios
 - 1.1.1.3.1.1 Caracterización de los andamios
 - 1.2 Generalidades del tejido óseo
 - 1.2.1 El Componente celular del tejido óseo
 2. MATERIALES Y MÉTODO
 - 2.1 Obtención de andamios poliméricos y su caracterización preliminar
 - 2.2 Obtención y Caracterización de un cultivo primario de osteoblastos
 - 2.3 Ensayos de crecimiento celular en los andamios poliméricos
 - 2.4 Caracterización de los andamios cultivados
 - 2.5 Desarrollo del modelo animal e implantación de las matrices extracelulares artificiales
 - 2.6 Realización de caracterizaciones a las muestras implantadas
 - 2.7 Obtención de resultados y desarrollo del modelo estadístico
 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 - 3.1 Caracterización preliminar de los andamios poliméricos
 - 3.1.1 Caracterización mediante microscopia electrónica de barrido
 - 3.1.2 Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)
 - 3.1.3 Pérdida de Masa (Degradación Hidrolítica)
 - 3.2 Obtención y Caracterización de un cultivo primario de Osteoblastos
 - 3.2.1 Aislamiento de Osteoblastos
 - 3.2.2 Fenotipificación
 - 3.3 Cultivo y Caracterización de los andamios
 - 3.3.1 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)
 - 3.3.1.1 Caracterización de los andamios rígidos cultivados (SEM)
 - 3.3.1.2 Caracterización de los andamios flexibles cultivados (SEM)
 - 3.3.1.3 Caracterización de los andamios flexibles cultivados (TEM)
 - 3.4 Desarrollo del modelo animal e implantación de las matrices extracelulares artificiales
 - 3.5 Recuperación y preparación de las muestras
 - 3.5.1 Validación del diseño experimental de tamaño crítico
 - 3.5.2 Análisis de interfaces en los defectos experimentales

3.5.2.1 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

3.5.2.2 Análisis mediante técnicas Histoquímicas

3.5.3.1 Análisis histomorfométrico

4. CONCLUSIONES

5. PERSPECTIVA Y PROSPECTIVA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Corte transversal de hueso largo
- Figura 2. Cresta iliaca (Hueso cortical)
- Figura 3. Hueso cortical
- Figura 4. Cresta iliaca (Hueso esponjoso)
- Figura 5. Cresta iliaca (Tejido medular)
- Figura 6. Hueso craneal (Tejido en formación)
- Figura 7. Hueso craneal (Tejido en formación)
- Figura 8. Hueso parietal Rata wistar
- Figura 9. Tejido óseo cerdo.
- Figura 10. Andamios rigidos (Técnica SEM)
- Figura 11. Andamios Flexibles (Técnica SEM)
- Figura 12. Espectro de un andamio rígido con CHT
- Figura 13. Espectro de un andamio flexible con CHT
- Figura 14. Comparación porcentajes de degradación
- Figura 15. Hueso parietal de rata wistar
- Figura 16. Hueso Parietal de rata wistar
- Figura 17. Andamio rígido de PLA con CHT
- Figura 18- 31. Procedimientos para aislar osteoblastos
- Figura 32. Observación de primera confluencia
- Figura 33. Observación de segunda confluencia
- Figura 34. Lamina de cultivo celular
- Figuras 35-36. Controles negativos para inmunohistoquímica
- Figuras 37-38. Expresión de Fosfatasa alcalina
- Figuras 39-40 Expresión de Osteocalcina
- Figuras 41 y 42. Expresión de Osteoprotegerina
- Figura 43. Siembra de osteoblastos

Figura 44. Andamios en caja de cultivo

Figuras 45 y 46. Matriz extracelular marcada para Fosfatasa alcalina

Figura 47. Matriz extracelular marcada para osteocalcina

Figura 48. Presencia de fibras en matrix extracelular

Figura 49. Osteoblastos en cultivo (control negativo para Fa)

Figura 50. Osteoblastos en cultivo (control negativo para Oc)

Figura 51. Osteoblastos en cultivo (tinción para Fa)

Figura 52. Osteoblastos en cultivo (tinción para Oc)

Figura 53. Etapas de desarrollo de la matriz extracelular

Figura 54. Andamio rígido sin quitosano (SEM)

Figura 55. Andamio rígido sin quitosano (SEM/EDS)

Figuras 56 y 57. Andamio rígido PLA con quitosano (SEM)

Figura 58. Andamio rígido PLA con quitosano (SEM/ EDS)

Figura 59. Fibra de quitosano (SEM/EDS)

Figura 60. Andamio rígido con quitosano (EDS)

Figura 61. Análisis elemental de andamio rígido (SEM/ EDS)

Figura 62. Andamio PLA con CHT (SEM)

Figuras 63 y 64. Matriz extracelular en andamio PLA/CHT

Figura 65. Andamio flexible PLA sin CHT (SEM)

Figura. 66 y 67. Andamio flexible PLA sin CHT (SEM/ EDS)

Figura 68. Andamio flexible PLA con CHT (SEM)

Figura 69. Andamio flexible PLA con CHT (SEM/ EDS)

Figura 70. Osteoblasto secretando vesículas (SEM)

Figura 71. Osteoblasto (TEM)

Figura 72. Vesículas electrodensas (TEM)

Figuras 73 y 74. Andamio rígido de PLA / CHT (TEM)

Figuras 75 y 76. Estructuras fibrilares con vesículas asociadas (TEM)

Figuras 77 y 78. Acumulo de matriz extracelular en un andamio flexible de PLA / CHT (TEM)

Figura 79. Matriz extracelular mineralizándose en un andamio flexible de PLA / CHT (TEM)

Figura 80. Crecimiento de cristales en un andamio flexible de PLA/CHT (TEM)

Figura 81. Preparación de tejidos blandos para injertar un andamio

Figura 82. Preparación de los defectos óseos y colocación del andamio

Figura 83. Tejido cicatrizal en preparación tipo control (vista periostica, SEM)

Figura 84. Tejido cicatrizal en preparación tipo control (vista meníngea, SEM)

Figura 85. Tejido cicatrizal en preparación tipo control (vista meníngea, SEM)

Figura 86. Análisis elemental de superficie perióstica en preparación control (EDS)

Figura 87. Análisis elemental de superficie meníngea en preparación control

Figura 88. Defecto control Técnica. H&E

Figura 89. Defecto control Técnica .Tricromía de Masson

Figura 90. Defecto control Técnica. Tricromía de Gomori

Figura 91. Defecto control, Zona de las interfaces. Técnica Tricrómica de Masson

Figura 92. Defecto control, Zona de las interfaces. Técnica Tricrómica de Gomori

Figura 93. Los 4 tipos de andamios injertados. Técnica SEM

Figura 94. Andamio tipo B, injertado. Técnica SEM

Figura 95. Análisis elemental de interfaz en andamio injertado tipo B. Técnica EDS

Figura 96. Andamio tipo C, injertado. Técnica SEM

Figura 97. Interfaz del andamio tipo C, injertado. Técnica SEM

Figura 98. Análisis elemental de la Interfaz del andamio tipo C, injertado. EDS

Figura 99. Interfaz del andamio tipo D, injertado. Técnica SEM

Figura 100. Análisis elemental de la Interfaz del andamio tipo D, injertado. EDS

Figura 101. Interfaz del andamio tipo H, injertado. Técnica SEM

Figura 102. Análisis elemental de la Interfaz del andamio tipo H, injertado. EDS

Figura 103. Andamio tipo B, Injertado. Técnica H&E

Figura 104. Andamio tipo B, Injertado. Técnica Tricromía de Masson

Figura 105. Andamio tipo B, Injertado. Técnica Tricromía de Gomori

Figura 106. Andamio tipo C, Injertado. Técnica Tricromía de Gomori

Figura 107. Andamio tipo D, Injertado. Técnicas H&E y Tricromía de Gomori

Figura 108. Andamio tipo H, Injertado. Técnica Tricromía de Masson

Figura 109. Andamio tipo H, Injertado. Técnica Tricromía de Gomori

Figura 110. Zona de la interfaz andamio tipo B. Técnica H&E

Figura 111. Zona de la interfaz andamio PLLA/ Fosfato de Calcio. Técnica H&E

Figura 112. Andamio tipo C, Injertado. Técnica H&E. 4X

Figura 113. Andamio tipo C, Injertado. Técnica H&E. 10X

Figura 114. Andamio tipo C, Injertado. Técnica Tricromía de Gomori, 4X

Figura 115. Andamio tipo C, Injertado. Técnica H&E. 40X

Figura 116. Andamio tipo D, Injertado. Técnica H&E. 10X

Figura 117. Andamio tipo D, Injertado. Técnica H&E. 40X

Figura 118. Andamio tipo D, Injertado. Técnica H&E. 40X

Figura 119. Andamio tipo D, Injertado. Técnicas TG y TM, 4X

Figura 120. Andamio tipo D, Injertado. Técnica H&E. 40X

Figura 121. Zona de la interfaz, andamio tipo D, Injertado. Técnica H&E. 10X

Figura 122. . Andamio tipo H, Injertado. Técnica H&E. 10X

Figura 123. Andamio tipo H, Injertado. Técnicas TG y TM, 10X

Figura 124. Andamio tipo H, Injertado. Técnicas TG y TM, 40X

Figura 125. Andamio tipo H, Injertado. Técnicas TG y TM, 40X

Figura 126. Andamio tipo H, Injertado. Técnica H&E. 10x y 40X

Figura 127. Proyección de pérdida de masa por degradación hidrolítica

Figura 128. Andamio tipo C, injertado. Técnica SEM

Figura 129. Andamio tipo C, injertado. Técnica SEM

Figura 130. Andamio tipo D, injertado. Técnica SEM

Figura 131. Análisis elemental Andamio tipo D, injertado, SEM /EDS

Figura 132. Fibras incorporadas en la matriz extracelular en un andamio tipo D. injertado, SEM /EDS

Figura 133. Zona de la interfaz en andamio tipo C injertado. Técnica SEM

Figura 134. Análisis elemental zona de la interfaz en andamio tipo C injertado. Técnica SEM / EDS

Figura 135. Zona de la interfaz en andamio tipo D. Técnica SEM

Figura 136. Zona de la interfaz en un andamio tipo D. Técnica SEM

Figura 137. Zona de la interfaz en un andamio tipo D. Técnica SEM/EDS

Figura 138. Andamio tipo D. Técnica SEM

Figura 139. Andamio tipo D. Técnica SEM. 200X

Figura 140. Andamio tipo D. Técnica SEM. 500x

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño de experimento para regresión logística, Andamios bioactivados. Fase in vitro.

Tabla 2. Análisis de la influencia del quitosano en la regeneración ósea en andamios de ácido poliláctico bioactivados, Fase in vitro.

Tabla 3. Análisis de la influencia del quitosano en la regeneración ósea en andamios de ácido poliláctico bioactivados, Fase in vivo.

Tabla 4. Tabla 4. Resultados estudio histomorfométrico (Promedios grupos)

Tabla 5. Comparación de grupos en análisis histomorfométrico

GLOSARIO DE TERMINOS

Alexa Flúor: Material colorante fluorescente que se excita a diferentes longitudes de onda, se une a proteínas y anticuerpos específicos permitiendo su visualización

Anticuerpo: Son estructuras de tipo glicoproteínas capaces de reconocer partes específicas de una proteína

B: Hueso

B-I: Interfaz hueso andamio

BMP: Proteínas morfogenicas de hueso

Bn: Hueso neo formado

B-V: Vaso sanguíneo

Cm: Celulas mixtas

CHT: Quitosano

Col: Colágeno

Col-Fb: Fibras colágeno

Col I: Colágeno tipo I

Col III: Colágeno tipo III

DAPI: (4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente utilizado para identificar los núcleos celulares, se une a zonas ricas en Adenina y Timina en la secuencia del ADN

EDS: Espectroscopia por energía dispersiva

Fb: Fibroblasto

Fenotipificación: Determinación de proteínas específicas que son expresadas por una célula

Inmunohistoquímica: Técnicas de identificación de proteínas utilizando anticuerpos, son unas técnicas muy específicas.

I.N: Interfaz de neoformación ósea

L-I: Interfaz izquierda

Mg: Superficie meníngea

Mv: Micro vesículas

Mx: Matriz extracelular

Ob: Osteoblastos

O.P: Osteona primaria

Osteoblastogenesis: Proceso de diferenciación del osteoblasto

Ot: Osteocito

P-Fb: Fibra polimérica

PLA: Ácido poliláctico

PLLA: Isómero L del ácido poliláctico

PLLA-Fb: Fibras de ácido poliláctico

PLAHT-Fb: Fibras de ácido poliláctico y quitosano

Po: Poro

Ps: Superficie periostica

R-I: Interfaz derecha

SEM: Microscopia electrónica de barrido

Sc: Scaffold o andamio

TEM: Microscopia electrónica de transmisión

TG. Tricromía de Gomori, técnica para identificar colágeno tipo III

TM: Tricromía de Masson, técnica para identificar colágeno tipo I

V: Vesículas

RELACIÓN DE ANEXOS

1. Acta aprobación por el comité de ética animal de la Universidad del Valle.
2. Influencia del quitosano sobre la colonización de andamios de ácido poliláctico en cultivo con osteoblastos (artículo sometido)
3. Regeneración de huesos craneales con técnicas de ingeniería de tejidos
4. Certificado ponencia presentada en el XVII Simposio de Investigaciones en Salud. Universidad del Valle. 2015. Presentación oral. (Valencia, CH, et al. *Regeneración de huesos craneales con técnicas de ingeniería de tejido*).
5. Ponencia presentada en el “5th Latin American Region IADR”, Bogota, Octubre 9 de 2015. Modalidad oral, (Valencia, CH, et al. *Chitosan influence on osteogenesis process in polylactic acid scaffold cultured with Osteoblast*).
6. Ponencia presentada en el VIII Congreso Internacional de Materiales - CIM, Paipa Octubre 28 de 2015. Modalidad oral, (Valencia, CH, et al. *Chitosan influence on osteogenesis process in polylactic acid scaffold cultured with osteoblast*).
7. Ponencia presentada en el 10th World Biomaterials Congress. Montreal. Canada, Mayo 17-22, 2016. Modalidad poster. (Valencia, CH, et al. *“Skull bone regeneration through the applicaton of tissue engineering techniques”*.).
8. Resumen de ponencia publicado en el Journal Frontier
9. Constancia de Pasantía Instituto de Química Universidad de Sao Paolo, Brasil. 2016
10. Constancia realización de trabajo de grado del programa Ingeniería de materiales. 2016. (Vidal, C; Roldan, C. Andamios de PLLA/CHT rígidos y flexibles, obtenidos por la técnica de electrospinning y moldeo por fusión para aplicaciones en regeneración óseo).
11. Constancia realización de trabajo de grado Maestria de Ingeniería de Materiales. 2016. (Maturana, H. Desarrollo de scaffolds elaborados en pla/quitosano para su posible aplicación en regeneración de tejido óseo).

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

MATERIALES Y METODO:

RESULTADOS:

CONCLUSIONES:

PALABRAS CLAVE

1. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo se pierde por procesos fisiológicos, patológicos y traumáticos, y dependiendo del volumen remanente una lesión podrá regenerarse o no. La ingeniería de tejidos combina técnicas de Ingeniería con principios de las ciencias biológicas con el fin de utilizar estrategias para regenerar el tejido dañado o perdido, el objetivo final de la Ingeniería de tejidos es restaurar el tejido de *novo* utilizando la capacidad regenerativa del organismo y apoyándose en la utilización de tres estrategias: Células, Moléculas de señalización (Factores de crecimiento) y Andamios o Matrices (1).

Utilizando metodologías de las Ingenierías, el hueso es estudiado como un sistema, y la cicatrización como un proceso en el que intervienen múltiples factores, identificándose algunos aspectos que son relevantes: Es necesario conservar un espacio para que se dé el proceso cicatrizal; se necesitan estructuras tridimensionales que sirvan de soporte a los procesos celulares y es indispensable la vascularización.

De las estrategias que plantea la ingeniería de tejidos, la más utilizada en el campo de la regeneración ósea ha sido la de los andamios o matrices, entendiéndose por andamio a la estructura tridimensional fabricada o procesada en un laboratorio con el fin de permitir el crecimiento celular y tisular, y como matriz el andamio cuando ha sido colonizado por células y éstas depositan su matriz extracelular.

De acuerdo a la norma ASTM F2150-02 (*Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products*), un andamio es un soporte, vehículo o matriz para facilitar la migración, adhesión, o transporte de células o moléculas bioactivas que es usada para reemplazar, reparar o regenerar tejidos.

En la práctica las tres estrategias se combinan para lograr el resultado esperado (1), por ejemplo un andamio puede ser utilizado para transportar células y/o sustancias bioactivas al sitio que se desea regenerar. Según este enfoque al aplicar un sustituto óseo en un sitio quirúrgico, éste actuará como una andamio que va a facilitar el proceso cicatrizal, y en el caso de un injerto se estará transportando además de células, las sustancias bioactivas tomadas durante la explantación.

La aplicación de los conceptos de ingeniería de tejido en el campo de la regeneración ósea parte de la comprensión de tres conceptos: Osteogénesis, Osteoinducción y Osteoconducción, ya que éstas serán las cualidades que los andamios, deberán presentar, (2).

Por osteogénesis se entiende la capacidad de un biomaterial para generar hueso nuevo a expensas de células que están incluidos en él; la osteoinducción es la cualidad de incentivar a la diferenciación celular por la presencia de sustancias bioactivas y como osteoconducción se entiende la capacidad del material de proveer soporte mecánico, sitios para anclaje celular y crecimiento vascular.

El injerto autólogo es el único que posee las tres cualidades, los demás productos utilizados en regeneración son osteoconductivos, pero dependiendo de su complementación con sustancias bioactivas pueden llegar a ser osteoinductivos.

Por poseer las tres cualidades, el hueso autólogo es considerado el Gold estándar en regeneración ósea, sin embargo presenta problemas de disponibilidad, se aumentan los tiempos quirúrgicos, los costos, y hay mayor morbilidad para el paciente (relacionado con el sitio donante) (1), lo que lleva a la necesidad de recurrir a tejidos procedentes de donantes de la misma especie (homoinjertos) o de otras especies (xenoinjertos).

Los homoinjertos normalmente se obtienen de donantes muertos, pero también se presentan problemas de disponibilidad y su procesamiento para garantizar su seguridad de uso es de alto costo. Por su parte los materiales (sustitutos óseos) procesados a partir de tejidos de otras especies, también son costosos y de disponibilidad limitada, ya que deben ser importados.

En Colombia existen cuatro procesadoras de tejido que suministran sustitutos óseos de tipo homoinjerto, en su mayor parte originados de tejido procedente de donantes muertos, producción que es absorbida principalmente por las salas de trauma de los hospitales.

Según el Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Republica de Colombia, (3), En el año 2014 el número de lesionados en accidentes de tránsito aumentó un 5,62% con relación al 2013, y el aumento del 2013 con relación al 2012 fue del 6%.

Al aumentar el número de heridos en accidentes de tránsito también aumenta la demanda de tejido para reemplazar, lo que requiere mayor cantidad de tejido donado; pero es paradójico que en Colombia al aumentar la necesidad de tejido disponible por el incremento en el trauma, se tengan disminución de la cantidad de tejido disponible por donación. Si se analizan las cifras del Instituto Nacional de medicina Legal, con relación al comportamiento de la donación de órganos y tejidos se aprecia un problema severo con la oferta.

En el año 2014 se realizaron 662 entrevistas familiares de potenciales donantes en muerte encefálica, para solicitar donación de componentes

anatómicos, lo que representó un aumento del 7% con respecto al 2013, pero la negativa familiar a la donación fue del 12,38%. (*Informe final Red Donación y Trasplantes 2014 v04. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Estadisticas/Informe%20final%20Red%20Donaci%C3%B3n%20y%20TrasPLLAntes%202014%20v04.pdf>*).

En el caso específico del tejido óseo, para el año 2014 se presentaron un total de 1.889 alertas de potenciales donantes de tejido osteo-muscular (el 92,1% provenían del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses (INMLCF) y el 7,9% restante de las IPS generadoras), sin embargo se descartó el 91,8% por diversas causas.

Al final del año 2014 se obtuvo un total de 224 donantes efectivos de tejido óseo, lo que representa una disminución del 27% respecto al año anterior ya que en el 2013 se obtuvo 305 donantes de tejido óseo. Del total de donantes efectivos se obtuvieron 826 tejidos procesados, pero fue necesario descartar el 42% de ellos (351) principalmente por control de calidad.

Las cifras presentadas alertan sobre la necesidad de desarrollar alternativas reales a los injertos óseos, que no sólo permitan la regeneración del tejido, sino que garanticen la seguridad del paciente; es lamentable no sólo el número tan bajo de donantes, sino que además de la poca cantidad de tejidos procesados, se deba descartar un 42% por control de calidad, ya que control de calidad en injertos se puede traducir como riesgo biológico.

Una de las razones del auge que está teniendo la Ingeniería de tejidos y su aplicación clínica, la medicina regenerativa, es la que permite romper con la dependencia que se tiene de donantes vivos o muertos, el hecho que las estructuras sean desarrolladas en un laboratorio, y la posibilidad de desarrollar en ellas células de los propios pacientes para obtener un tejido con características de normalidad, garantizaría su éxito como sustituto tisular con seguridad sanitaria, controlando adicionalmente otros factores como disponibilidad, costos, tiempos de espera, morbilidad, etc.

En esta investigación se propuso desarrollar andamios poliméricos y bioactivarlos por osteoblastos, para obtener matrices extracelulares sintéticas, con el fin de estimular la cicatrización por regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en huesos craneales de ratas Wistar adultas; por su carácter multidisciplinario se contó con la participación de grupos de investigación de las áreas de Química, Ingeniería de materiales y Ciencias Biomédicas, lo cual permitió enriquecer el trabajo con el aporte realizado desde cada componente.

En la estructura del trabajo se prefirió seguir el esquema clásico. La investigación fue realizada por fases como se describe en el capítulo de Materiales y Método; en cuanto a análisis de resultados se siguió como hilo conductor el intento por resolver la pregunta problema ¿Un andamio polimérico bioactivado por osteoblastos, será capaz de soportar el crecimiento celular y tisular, mostrando actividad osteogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (en defectos de tamaño crítico)?

La pregunta problema llevó al planteamiento de hipótesis y a su contraste mediante análisis estadístico, sin embargo algunos de los resultados más interesantes fueron de tipo cualitativo y se utilizaron para describir el proceso de biointegración *in vitro* e *in vivo* de las estructuras poliméricas.

Para comprender los procesos biológicos que se estaban dando, se utilizaron diferentes técnicas como Microscopia electrónica de barrido y transmisión, Espectroscopia por energía dispersa (EDS), Histoquímica (Hematoxilina & Eosina, Tricromía de Masson y Tricromía de Gomori), así como técnicas de inmunohistoquímica (Detección de expresión de Fosfatasa alcalina y Osteocalcina), como se revisará en los capítulos correspondientes.

Para una mejor comprensión de los resultados, en esta introducción se incorporaron dos apartes sobre generalidades de Ingeniería de tejidos y sobre tejido óseo.

1.1 La Ingeniería de tejidos óseos

La Ingeniería de tejidos óseos, busca aplicar las estrategias de la Ingeniería de tejidos en el campo de la regeneración ósea, buscando alternativas viables a los injertos autólogos. Su desarrollo se produjo ante la necesidad de buscar sustitutos efectivos al tejido óseo de origen natural (autoinjertos, homoinjertos y xenoinjertos) y en esta búsqueda se dio una evolución a partir de unos materiales básicamente biocompatibles, simplemente osteoconductores, hasta llegar a los actuales que son biomiméticos y con mejores cualidades biológicas,(4) .

1.1.1. Las Estrategias de la ingeniería de tejidos

Para cumplir con su objetivo de estimular la formación de nuevo tejido, se aplican tres estrategias: la primera está basada en la utilización de células diferenciadas o no; la segunda utiliza sustancias bioactivas como factores de crecimiento, que ayudarán a que las células indiferenciadas maduren al tipo específico de células que se necesita, y que las células maduras expresen su fenotipo; la tercera estrategia busca desarrollar los andamios, estructuras tridimensionales que darán soporte a las células, almacenarán

las sustancias bioactivas y permitirán la formación de una matriz extracelular sintética.

En la práctica las tres estrategias se combinan en el objetivo único de lograr la regeneración tisular, de esta forma el andamio permitirá que las células lo colonicen y se expresen produciendo factores de crecimiento que estimularán los procesos celulares o la expresión fenotípica de las células maduras, transformándose así el andamio en una matriz extracelular sintética,(5).

1.1.1.1 Estrategia basada en células

En el tejido óseo están presentes diferentes tipos celulares, como células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo, y osteoclastos.

Cuando se toma hueso autólogo y se injerta en un sitio quirúrgico, se está utilizando el tejido óseo colectado como un transportador de las células presentes en él, y de componentes de la matriz extracelular; ésta es una aproximación simple a la utilización de células en Ingeniería de tejidos(6).

La estrategia basada en células consiste en utilizar un andamio de cualquier tipo (natural o sintético), cultivarlo con células en medios adecuados, permitir que estas células se diferencien si es el caso, proliferen, y se expresen; para luego ser injertadas en un individuo, buscando que las células incorporadas desarrollen una función regeneradora.

En la terapia con células se pueden utilizar células óseas tanto inmaduras como maduras; en el caso de partir de células inmaduras, se deberá permitir su diferenciación a células formadoras de hueso (osteoblastos), las fuentes más comunes para su obtención son médula ósea y tejido adiposo.

El trasplante de células en regeneración ósea, se ha realizado en forma exitosa a nivel preclínico utilizando modelos animales, y se tiene como objetivo mejorar las técnicas para colectar las células, su aislamiento, cultivo, y preparación para futuras aplicaciones clínicas, (7)· (8).

Aunque se tiene seguridad del beneficio a futuro de la aplicación de células en las terapias óseas regenerativas, falta claridad en algunos aspectos como: Implicaciones éticas, fuentes de obtención (células autólogas o xenólogas), tipos de células (diferenciadas no diferenciadas), condición inmunológico, etc., en este sentido algunos autores han propuesto el uso de células mesenquimales (indiferenciadas), originadas en tejido adiposo por disponibilidad y facilidad de obtención (7)· (9); Zhang, et al. (2012) en una revisión sistemática exploran el potencial de las células mesenquimales

embrionarias de origen alogénico (10), Stockmann et al. (2012) utilizan un modelo animal para evaluar el potencial osteogénico de células mesenquimales autólogas de varias fuentes (11). Liu, et al (2013), estudian células mesenquimales reprogramadas para producción de BMPs, y trasplantadas en andamios (12).

En la cavidad oral se han identificado como fuentes potenciales de células mesenquimales las cavidades medulares, el periostio, el endostio, el tejido óseo, el ligamento periodontal, la pulpa dental (6), gérmenes dentarios y glándulas salivales, (13), (14).

Hasta el momento la estrategia basada en células, aunque ha mostrado ser promisoría en condiciones *in vitro* y permite formación ectópica de hueso, no ha tenido mayor aplicación clínica, debido a que las células necesitan un medio físico y biológico que les permitan sobrevivir *in situ* mientras se reestablece la vascularidad.

El principal inconveniente en el desarrollo de esta estrategia, es garantizar el suministro de nutrientes y oxígeno en los primeros días, debido a que una célula ósea no puede estar a más de 200 μm de un vaso sanguíneo, lo que lleva a la muerte de una cantidad de células en la primera semana de Injertación, (15), se calcula que de la pequeña porción que sobrevive sólo una entre 10^3 o 10^4 son potencialmente activas, (6).

1.1.1.2 Estrategia basada en factores de crecimiento y sustancias bioactivas

Los factores de crecimiento, sustancias bioactivas que participan en la regulación molecular de los procesos de diferenciación y maduración celular, a través de diferentes vías como la de las BMPs (Proteínas Morfogenicas del hueso) o la de la Wnt, (proteínas asociadas a los genes wingless) , han sido sugerido como posibles inductores en técnicas de ingeniería de tejido para mejorar la cicatrización ósea y estimular la regeneración, (6).

La idea de aislar y aplicar factores de crecimiento como elementos osteoinductores, fue propuesta primero por Urist en la década de 1960 y desarrollada por Strates en los años setenta, y Reddi en los ochenta; quienes mostraron formación ectópica de hueso en varios biomodelos (6).

En esta estrategia se utilizan andamios como transportadores de los factores de crecimiento, buscando una liberación controlada de las biomoléculas, para que se estimulen los procesos celulares de reclutamiento, proliferación, diferenciación y maduración, (1) y se facilite la adhesión de proteínas y

células a la matriz extracelular artificial (andamio), mejorándose la biointegración con el tejido óseo

La combinación inicialmente de los andamios con factores de crecimiento, permitió obtener matrices biomiméticas con aplicación en procesos reparativos, (16), (17).

1.1.1.3 Estrategia basada en andamios

Como alternativas al hueso autólogo, surgieron los substitutos óseos, éstos nacen a partir del reconocimiento de la matriz extracelular y de su importancia en el proceso regenerativo.

Los primeros materiales usados como substitutos óseos (1960 - 1970), constituyen la primera generación de andamios, se procuraba que fueran biocompatibles y no interfirieran con los procesos de cicatrización, el objetivo era obtener materiales con propiedades físicas y químicas que se asemejaran al tejido a reemplazar, reaccionando mínimamente con los sistemas biológicos, (4).

La segunda generación de andamios buscaba regenerar el tejido, por medio de interacciones químicas entre el material y las células; esto significó un salto importante porque se estaba pensando en características biológicas determinadas: Biocompatibilidad, bioreabsorción, biodegradación, y bioactividad. Los materiales de segunda generación sólo eran osteoconductores, permitían crecimiento celular y tisular limitado, pero no se llegaba a la completa regeneración del defecto quirúrgico,(4).

Los investigadores se enfocaron en el estudio mismo de los materiales; en los nuevos diseños se debió tener en cuenta que no sólo iban a estar involucrados en un entorno biológico, sino también, que las propiedades de superficie son fundamentales para generar una respuesta al estar en contacto con las células; también es importante la biomecánica que se origina de su estructura porosa, la cual debe ser tomada en cuenta en el diseño de las nuevas aplicaciones (4), (18), (19).

El estudio de los materiales con relación a un entorno biológico, lleva a replantear algunos conceptos y a identificar la necesidad de tener superficies funcionalizadas y biomiméticas que favorezcan la interacción con las moléculas de agua, la absorción de proteínas, así como la adherencia, proliferación y diferenciación celular.

La tercera generación de andamios surgió de una mayor comprensión del entorno biológico y de la naturaleza íntima de los materiales, y tiene como objetivo la osteoinducción. Para lograr el objetivo se han propuesto diferentes

estrategias como incorporar células y/o factores de crecimiento, y acercarse más a la estructura íntima de la matriz extracelular por medio de nuevas técnicas de fabricación; de esta forma, viejos materiales considerados osteoconductivos pueden volverse osteoinductivos al mejorar sus características de superficie; Fukuda, et al. (2011) (20), obtienen formación ectópica de hueso al implantar cilindros porosos de titanio en piel y músculo y proponen que en condiciones de adecuado suministro sanguíneo, las características de superficie permitan un comportamiento osteoinductor; Fielding, et al. (2013), (21) reportan propiedades osteoinductoras de andamios de fosfatos de calcio, obtenidos mediante impresión 3D.

1.1.1.3.1 Características de los andamios

Del estudio de los biomateriales y de su interacción con el entorno biológico surgen las principales características que deben tener los andamios o Scaffolds (1):

1. Proveer resistencia mecánica temporal
2. Actuar como sustrato para el depósito y crecimiento del material osteoide
3. Tener arquitectura porosa para permitir la vascularidad y el crecimiento óseo
4. Incentivar la migración celular al sitio del defecto, y promover la actividad de reparación y regeneración
5. Degradarse de manera controlada para permitir el reemplazo progresivo, y facilitar la transferencia de carga al hueso en desarrollo
6. Degradarse en productos no tóxicos que puedan ser eliminados con seguridad por el organismo
7. No causar respuesta inflamatoria significativa
8. Tener posibilidad de esterilización sin pérdida de bioactividad

Según Hollister, (citado por Billström et al. 2013, (22)) para su aplicación clínica los andamios deberían tener forma, función, fijación y formación. La forma es el requisito de llenar completamente la cavidad ósea; la función se relaciona con los requerimientos biomecánicos relacionados con la carga; la fijación tiene que ver el contacto íntimo con el tejido residual y con prevenir la movilidad; por formación se entiende que el biomaterial debe promover la formación ósea.

Otras características deseables son: Superficie biomiméticas o capacidad de copiar una o más características de la matriz extracelular natural; Biodegradabilidad o posibilidad de mimetizar la degradabilidad enzimática de algunos componentes como el colágeno y otros; también es deseable que tenga algunas propiedades mecánicas necesarias. para soportar las fuerzas generadas durante la cicatrización (16).

Para algunas aplicaciones es importante la microestructura, algunos deberán parecerse al hueso esponjoso, mientras otros podrán ser elaborados con disposición fibrosa, con unos diámetros en escalas nanométricas o submicrométricas que se asemeje a estructuras proteicas como el colágeno, también se busca que tengan posibilidades de auto ensamble, basándose en que los componentes de la matriz se organizan en patrones determinados por diferentes interacciones químicas, eléctricas o de hidrofiliidad / hidrofobicidad. (16)

En la elaboración de los andamios se han utilizado diferentes materiales naturales como colágeno y quitosano, o sintéticos como el ácido poliláctico (PLLA), el ácido poliglicólico (PGA), la policaprolactona (PCL), el fosfato de Calcio, etc. (23) , (24), (25).

El ácido poliláctico es un poliéster biodegradable, alifático (26); presenta dos isómeros (L- PLA y D- PLA), siendo la forma L (L-PLA) la de más uso en aplicaciones médicas.

El isómero L-PLA o PLLA es uno de los materiales más utilizados para fabricar estructuras en regeneración tisular, debido a sus características de biocompatibilidad y biodegradación, así como sus características físicas y químicas (27). La utilización de PLLA confiere al andamio la resistencia mecánica necesaria, mientras se da la colonización celular (28) y su eventual remplazo por nuevo tejido.

El quitosano es un polímero natural, biodegradable, obtenido a partir de la desacetilización de la quitina, compuesto por glucosamina y N- Acetil Glucosamina, (29), (30). Al quitosano se le reconoce excelentes propiedades biológicas, alta hidrofiliidad, biocompatibilidad y adecuada biodegradabilidad (29), (25).

Las propiedades biológicas del quitosano han sido atribuidas a su naturaleza catiónica cuando está en un medio con pH ligeramente ácido, lo que le permite interactuar electrostáticamente con los aminoglicanos, proteoglicanos y otras moléculas cargadas negativamente, presentes en la matriz extracelular, (28)

Hasta ahora no se ha encontrado un material que cumpla con todos los requisitos que debe tener un andamio o un sustituto para regeneración ósea (24), lo que lleva a la combinación de dos o más productos para obtener estructuras con mejores características físicas, químicas o biológicas; un ejemplo de ello es la policaprolactona, la cual presenta cualidades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad estructural y propiedades mecánicas, pero a la vez una baja bioactividad que lo lleva a presentar menor afinidad para las células, por esta razón se propone su combinación con

PLLA para tener un producto menos hidrofóbico, con degradabilidad ajustable y buenas propiedades mecánicas, (31).

En el desarrollo actual de estructuras para regeneración ósea, se busca que unos materiales como el PLLA aporten resistencia mecánica, otros como el ácido poliglicólico o la policaprolactona permitan ajustar degradabilidad o características físicas particulares, mientras productos como el colágeno o el quitosano mejoren las cualidades biológicas (25), (32).

1.2 Generalidades del tejido óseo

El hueso puede ser estudiado como un órgano, con una estructura compleja compuesta por varios tejidos: Tejido óseo, tejido sanguíneo y componente de médula ósea; además con funciones tan diversas como servir de soporte mecánico, proteger estructuras anatómicas, contribuir al movimiento, participar en la homeostasis del calcio, actuar como reservorio de células madres y de minerales para la homeostasis, (6), (33), (34).

Macroscópicamente el hueso tiene dos componentes: el hueso cortical en su parte externa, de consistencia dura, densa, con poca vascularización y el hueso esponjoso en la parte interna, poco denso, muy poroso, vascularizado con cavidades delimitadas por trabéculas las cuales contienen la médula ósea,(35), (Fig. 1).

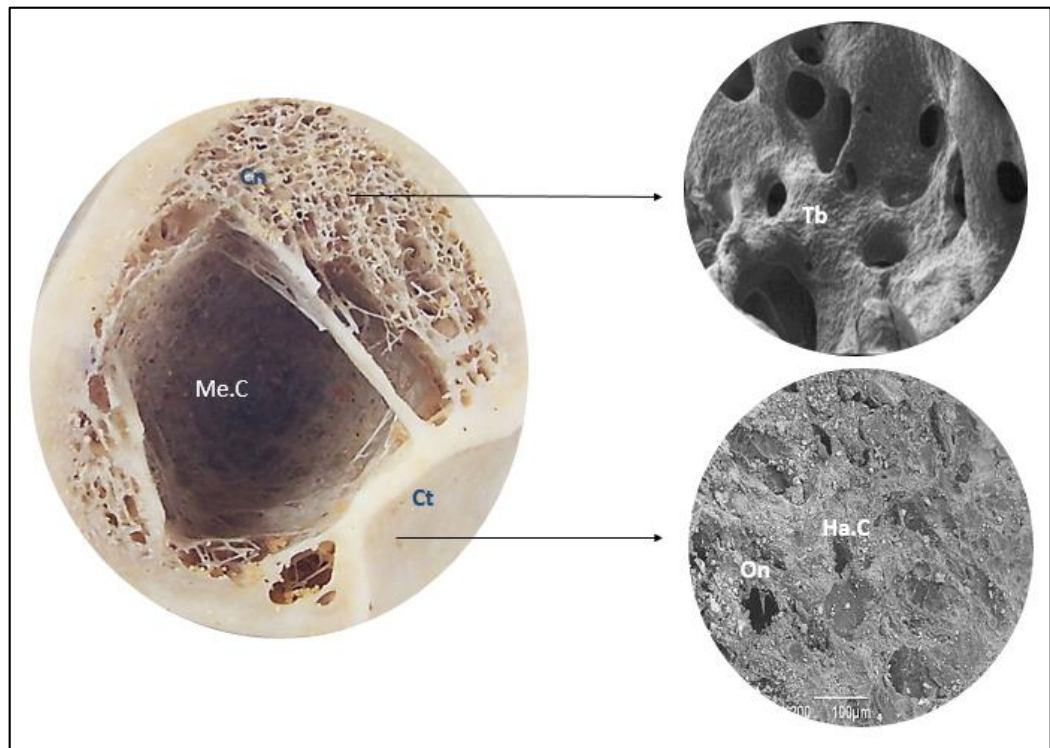


Figura 1. A la izquierda, corte transversal de un hueso largo. La imagen derecha superior corresponde a tejido esponjoso, técnica SEM a 100X; La inferior a hueso cortical, técnica SEM100X. Ct: Hueso cortical; Me.C: Canal medular; Tb trabéculas; On: Osteona; Ha.C.: Canal de Havers. Archivo Carlos Humberto Valencia (CHV)

Como tejido, el hueso está formado por una matriz ósea extracelular no mineralizada (Osteoide), por una matriz extracelular mineralizada y por cuatro grupos de células responsables de su mantenimiento, (Osteoblastos, Osteoclastos, Osteocitos y Células de Revestimiento), (34), (36).

A nivel microscópico tanto la parte cortical como la esponjosa tienen los mismos componentes, aunque organizados en forma diferente; en la porción cortical los osteocitos están distribuidos en forma concéntrica alrededor de un canal central (Canal de Havers), formando una estructura denominada Osteona, la cual está delimitada por una línea distinguible (Línea de cemento), (Figs. 2 y 3).

La Osteona es considerada la unidad multicelular básica del hueso cortical, es de forma cilíndrica y en su conformación intervienen múltiples células (Osteocitos) comunicadas entre sí por medio de prolongaciones citoplasmáticas; las osteonas se comunican unas con otras para conformar el Sistema haversiano, responsable de censar los estímulos físicos y químicos que sufre el tejido y comunicarlo a las demás células componentes del tejido óseo (osteoblastos, células de revestimiento y osteoclastos (33).

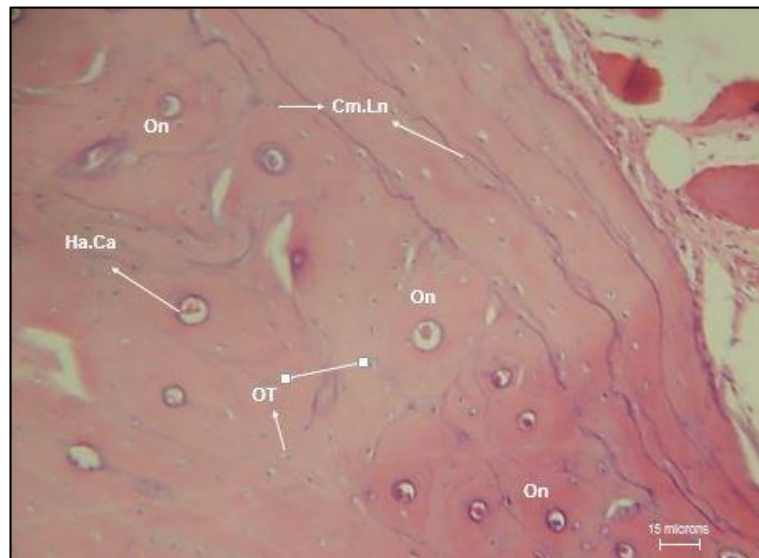


Fig. 2. Cresta Iliaca de Conejo. Hueso cortical. On: Osteona; Ha.Ca: canal de Havers; Ot: Osteocito; Cm.Ln: Línea de Cemento. Técnica H & E. Magnificación 10X. Archivo CHV.

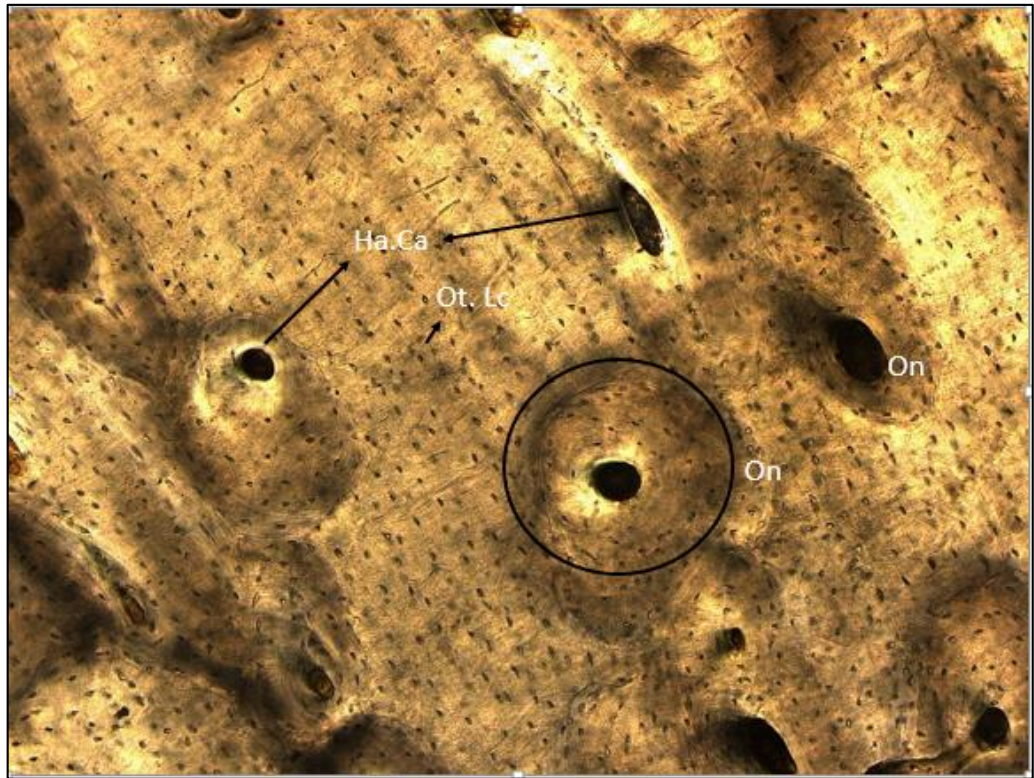


Fig. 3. Hueso cortical. Técnica desgaste, magnificación 10x, se aprecian varias osteonas (On) con sus canales de Havers y numerosas lagunas osteocitarias (Ot.Lc). Archivo CHV.

La unidad multicelular básica del hueso esponjoso es la trabécula, estructura dura que delimita una cavidad medular, formada por osteocitos inmersos en pequeñas lagunas y rodeados por matriz extracelular mineralizada (Fig. 1 y 4); por otra parte la cavidad medular contiene en su interior un tejido blando compuesto por tejido adiposo, tejido de soporte, vasos sanguíneos y células indiferenciadas, (Fig. 5).

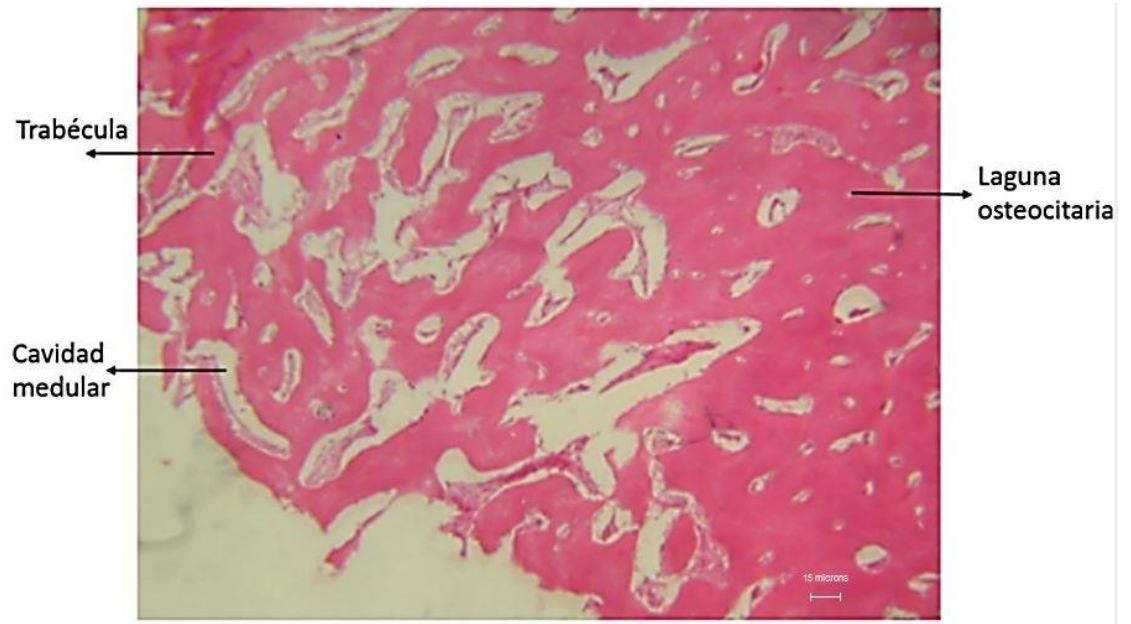


Fig.4. Cresta iliaca de Conejo. Se aprecian trabéculas con osteocitos en sus lagunas y espacios medulares. Técnica H & E, 10X. Archivo CHV.

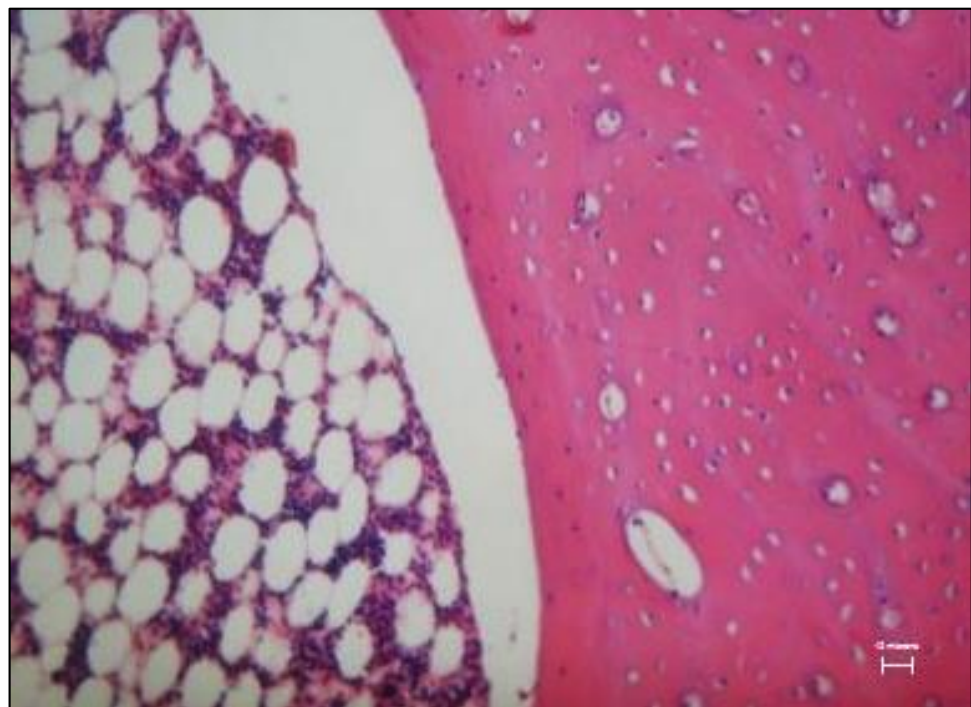


Fig. 5. Cresta Iliaca de Conejo. A la Izquierda se aprecia tejido medular y a la derecha hueso esponjoso con numerosos osteocitos en sus lagunas. Técnica H&E, 10X, Archivo CHV.

1.2.1 El Componente celular del tejido óseo

Las células propias del tejido óseo son el osteoblasto, el osteocito, la célula de recubrimiento óseo y el osteoclasto.

El osteoblasto se origina a partir de células mesenquimales residentes en medula ósea, y da origen al osteocito y a la célula de recubrimiento por diferenciación terminal.

Una vez la célula mesenquimal se diferencia a osteoblasto (Ob), éste inicia la producción de matriz ósea extracelular; el proceso de maduración de los osteoblastos está relacionado con el proceso de desarrollo de la matriz, ésta primero se forma, luego madura y finalmente se mineraliza.

Para que ocurra el proceso de desarrollo de la matriz progresivamente, se activan genes y se producen diferentes proteínas responsables de procesos específicos como las proteínas colágeno fundamentalmente los tipos I y III, además proteínas no colágeno como la fosfatasa alcalina y la osteocalcina, consideradas marcadores del fenotipo osteoblástico (37).

La matriz madura como material osteoide, un tejido compuesto por fibras colágeno que interactúan con diferentes proteínas y progresivamente va a sufrir procesos de mineralización.

Cuando el osteoblasto llega a la fase de mineralización de la matriz extracelular, la mayoría de ellos hacen apoptosis(50%-70%) (37) y el resto realizan diferenciación terminal a osteocitos y a células de recubrimiento.

Los osteocitos (Ot) pasan a ser el tipo celular más numeroso en el tejido, comprendiendo aproximadamente un 95% de las células óseas, con una densidad celular normal de entre 20.000 y 80.000 células/mm³, (38).

La forma del osteocito maduro es aplanada y alargada, de 10 µm en su longitud mayor y con prolongaciones citoplasmáticas de 10-100 nm de diámetro que les permiten establecer contactos, ya que se conservan algunas de las comunicaciones célula/célula que por prolongación citoplasmáticas y uniones GAP se habían establecido durante la osteoblastogénesis, de esta forma la red osteocitaria se puede comunicar con otras células como los preosteoblastos, osteoblastos y células de recubrimiento garantizando la integridad del hueso como tejido, (39).

Las figuras 6 y 7 corresponden a un tejido óseo en formación, son visibles osteoblastos, lagunas osteocitarias, osteocitos en sus lagunas,

prolongaciones osteocitarias y líneas de cemento separando porciones de tejido óseo recién formado.

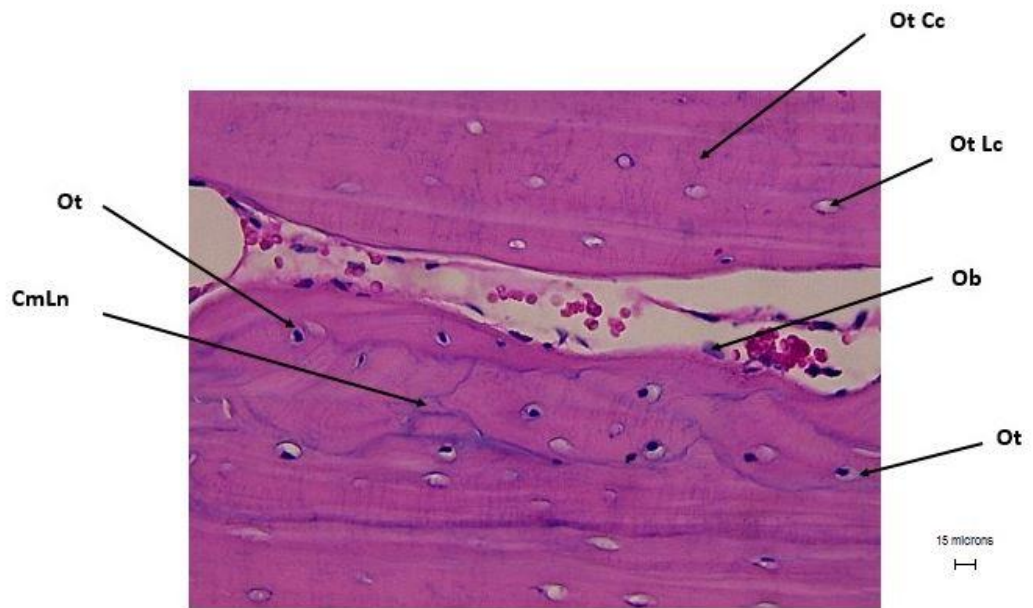


Fig. 6. Hueso craneal de Rata Wistar. Técnica H&E. 10X.. Ot.Cc: Canalículo osteocitario; Ot. Lc: Laguna osteocitaria; Ob: Osteoblasto; Ot: Osteocito, Cm.Ln: Línea de cemento. Archivo CHV. 2016.

Las Células de recubrimiento óseo son de apariencia aplanada, se encuentran sobre las superficies externas e internas del hueso, forman el endostio y participan activamente en el proceso de remodelado, marcando los sitios para resorción o aposición (37), para lo cual establece comunicación tipo unión Gap con el osteocito, osteoblasto y osteoclasto (40).

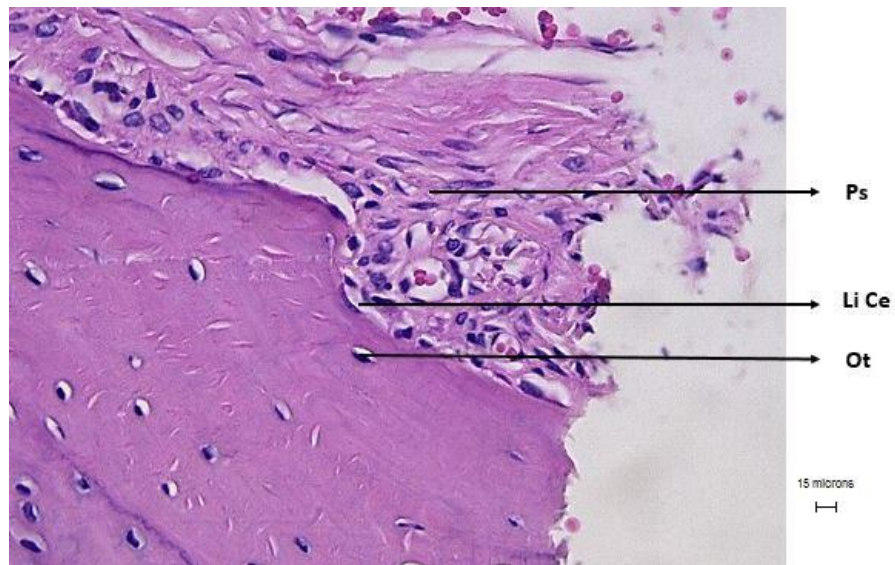


Fig. 7. Hueso craneal de Rata Wistar. Se aprecia un tejido óseo en formación. Técnica H&E. 40X. UNIVALLE 2016. Ps: Periostio; Li.Ce: Célula de Recubrimiento óseo; Ot: Osteocito. Archivo CHV. 2016

Los osteoclastos (Oc) son células multinucleadas, pueden alcanzar un tamaño de 150 μm y tener hasta 50 núcleos, su función principal es la degradación de la matriz extracelular y participan en el remodelado óseo, en coordinación con los osteoblastos y las células de recubrimiento. (41)

Los osteoclastos tienen origen hematopoyético, se forman en médula ósea a partir de la fusión de precursores del linaje monocítico- macrófago en un proceso llamado osteoclastogénesis (37), la degradación de la matriz la realizan mediante mecanismos de degradación ácida y degradación proteolítica con participación de diferentes enzimas, entre ellas la fosfatasa ácido tartrato resistente.

En cortes histológicos normalmente se encuentran en la periferia sobre el endostio, por debajo del periostio, cerca de canales de Havers, o en sitios de remodelado(37), pueden ser identificados mediante técnicas Inmunohistoquímicas por la presencia de la actividad de la fosfatasa ácido tartrato resistente, una enzima que el tejido óseo es expresada fenotípicamente por esta célula (Figuras 8 y 9).

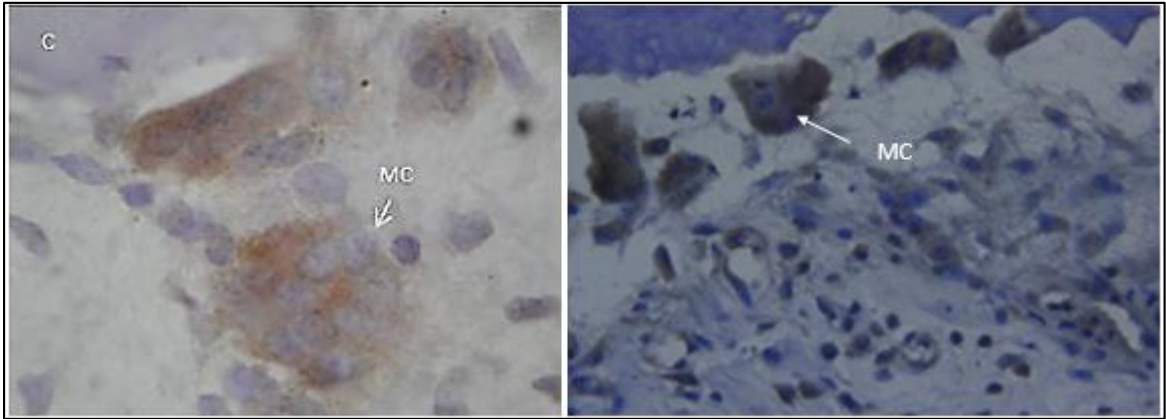


Figura 8. Expresión de TRAP. Hueso parietal de Rata Wistar. Técnica IHQ para TRAP. 100X. MC: Celulas multinucleadas expresando TRAP (Color marrón). Archivo CHV.

Figura 9. Expresión de TRAP. Tejido óseo de cerdo. Técnica IHQ para TRAP. 100X. MC: Celulas multinucleadas expresando TRAP (Color marrón). Archivo CHV.

El remodelado óseo se da a través de la acción coordinada de varias células en una estructura denominada Unidad Básica Multicelular (BMU), mediante la cual los osteoclastos degradan la matriz extracelular, los osteoblastos la forman de nuevo y los osteocitos y las células de recubrimiento participan como inductores del proceso. Para que se dé la remodelación debe existir una comunicación permanente entre los cuatro tipos de células.

Los osteoblastos regulan la osteoclastogénesis mediante la producción de RANK ligando (RANKL) y osteoprotegerina (OPG).

El RANKL es el activador del factor $\kappa\beta$, conocido por RANK, el cual es una proteína de membrana que en el tejido óseo es expresada en la superficie de los osteoclastos(42); la OPG es un receptor que se une al RANKL bloqueando la unión RANKL-RANK interfiriendo con la osteoclastogénesis y con la activación de los osteoclastos.

Los osteocitos son los encargados de censar la calidad ósea y el nivel de estrés, se comunican entre sí y con los osteoblastos a través de prolongaciones citoplasmáticas, ubicadas en los canales osteocitos, pero también pueden regular la osteoblastogénesis mediante la producción de esclerotin y la osteoclastogénesis mediante la producción de RANKL (37).

Por su parte, las células de recubrimiento interactúan tanto con el osteoclasto como con el osteoblasto, marcando los sitios de resorción y aposición y previniendo la interacción inapropiada de los precursores osteoclásticos sobre la superficie ósea (37).

2. MATERIALES Y METODO

En esta investigación se planteó como objetivo general, desarrollar matrices extracelulares artificiales con el fin de promover la regeneración ósea en sitios de difícil cicatrización; y como objetivos específicos describir la actividad osteogénica de la matriz en condiciones *in vitro* y describir la actividad osteogénica de la matriz en condiciones *in vivo*.

Para alcanzar los dos objetivos, se desarrolló una metodología por fases de acuerdo al siguiente orden.

1. Obtención de andamios poliméricos y su caracterización preliminar
2. Obtención y caracterización de un cultivo primario de osteoblastos
3. Ensayos de crecimiento celular en los andamios poliméricos
4. Caracterización de los andamios cultivados
5. Desarrollo del modelo animal e implantación de las matrices extracelulares artificiales
6. Realización de caracterizaciones a las muestras implantadas
7. Obtención de resultados y desarrollo del modelo estadístico

2.1 Obtención de andamios poliméricos y su caracterización preliminar

Los andamios fueron elaborados y caracterizados en el Laboratorio de la Universidad del Valle por un grupo de estudiantes de Ingeniería de Materiales (43), como insumos se utilizaron ácido poliláctico de mediano peso molecular (Natureworks®) de 85.000 g/mol y quitosano (Sigma-Aldrich).

Se elaboraron estructuras de 5 milímetros de diámetro por un milímetro de grosor, utilizando la técnica de moldeo por fusión. Para la conformación se trituraron los pellets de PLLA hasta un tamaño de 250 micras y se mezclaron con partículas de NaCl de 74, 105, 149, y 177 micras, en una proporción PLLA / NaCl de 30/70.

Se diseñó un molde de acero inoxidable AISI 316, de 20 cavidades con un diámetro de 5mm en donde se introdujeron barras del mismo diámetro para generar las estructuras, en las cavidades se depositaron las mezclas de PLLA y NaCl en una proporción de 30/70 respectivamente, bajo una presión de 1000 psi y una temperatura de 170°C.

Una vez obtenidos los andamios, se procedió a eliminar la sal mediante inmersión en un Beaker con agua destilada y agitación magnética a 700 rpm, cambiando el agua periódicamente hasta que la resistividad del agua contenida en el Beaker llegó

a un valor de 3.0 mega ohmios. Los andamios se secaron en una plancha a 50°C hasta que su peso fue constante, posteriormente se realizó el proceso de recubrimiento con quitosano (CHT), para lo cual se introdujeron las probetas porosas dentro de una jeringa con una solución de CHT al 0.5% de concentración para lograr impregnar el área superficial del andamio y se ejerció presión mediante el pistón de la jeringa hasta que éste dejó de burbujear.

Para fabricar los andamios flexibles en la técnica de electrohilado simple, se realizaron disoluciones de PLLA al 8% empleando cloroformo como disolvente; para el electrohilado coaxial se diluyó ácido acético en agua destilada al 1%, para luego ser mezclado con quitosano (CHT) al 2%.

Una vez obtenido los andamios rígidos y flexibles se realizaron caracterizaciones con Microscopia electrónica de barrido, Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), Degradación hidrolítica y determinación de porosidad

2.2 Obtención y caracterización de un cultivo primario de osteoblastos

Esta fase se desarrolló en el Laboratorio *In Vitro* de la Universidad del Valle. Se estandarizó un cultivo primario de osteoblastos a partir de huesos craneales de ratas Wistar de 5 días de edad, después de la segunda confluencia se realizó tipificación mediante determinación de la expresión de Fosfatasa alcalina (Fa), Osteocalcina (Oc) y Osteoprotegerina (Op).

2.3 Ensayos de crecimiento celular en los andamios poliméricos

Los andamios rígidos y flexibles fueron cultivados con osteoblastos por 15 días con medio de cultivo osteogénico, en cabina de incubación con CO₂ al 5% y cambio de medio cada tres días, con el fin de obtener las matrices sintéticas.

2.4 Caracterización de los andamios cultivados

Para determinar la actividad osteogénica *in vitro*, se realizaron estudios con microscopia electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM).

2.5 Desarrollo del modelo animal e implantación de las matrices extracelulares artificiales

Después de 15 días de cultivo con osteoblastos y una vez verificada la formación de matriz extracelular, las matrices extracelulares sintéticas fueron implantadas en huesos parietales de Ratas Wistar por tres meses, en defectos de tamaño crítico de 5 milímetros de diámetro, utilizando el modelo de control por defecto vacío.

A los biomodelos se les realizó 2 preparaciones a ambos lados de la sutura sagital; respetando las suturas.

- Número total de biomodelos: 40

- Número de grupos: Dos
- Numero de subgrupos: Dos
- Subgrupo 1: Estudios con microscopia electrónica de barrido, compuesto por 22 biomodelos para un total de 44 preparaciones.
- Subgrupo 2: Estudios de Histoquímica e inmunohistoquímica), compuesto por 18 Biomodelos para un total de 36 preparaciones

Preparaciones y tipo de andamio injertado:

- Andamios rígidos sin quitosano (B): 15 (10 para SEM y 5 para IHQ)
- Andamios rígidos con quitosano (C): 19 (9 para SEM y 10 para IHQ)
- Andamios flexibles con quitosano (D): 17 (8 para SEM y 9 para IHQ)
- Andamios flexibles sin quitosano (H):15 (8 para SEM y 7 para IHQ)
- Defectos control (sin andamio): 14 (9 para SEM y 5 para IHQ)

La determinación del tamaño de muestra se realizó por asimilación de la Norma ISO 10993-6, [4, 5,6 Animales de ensayo y lugares de implantación]).

2.6 Realización de caracterizaciones a las muestras implantadas

Después de tres meses de implantación, las muestras fueron recuperadas, fijadas en una solución de PBS-Glutaraldehído al 2% y procesadas con el fin de evaluar la biointegración de las matrices y determinar la capacidad osteogénica, con este fin se realizaron análisis por microscopia electrónica de barrido, histoquímica e inmunohistoquímica.

2.7 Obtención de resultados y desarrollo del modelo estadístico

En la propuesta de la investigación se plantearon como hipótesis sobre el componente *in vitro*:

- *Hipótesis nula*: Al estudiar los dos tipos de andamios cultivados, con o sin quitosano no se encontrarán diferencias con relación a la variable de respuesta 1.
- *Hipótesis alterna*: Al estudiar los dos tipos de andamios cultivados con o sin quitosano se encontrarán diferencias con relación a la variable de respuesta 1.

Variable de respuesta: Evidencia de actividad osteogénica (presencia de elementos de la matriz ósea extracelular)

Sobre el componente *In Vivo*, se Plantearon como hipótesis:

- *Hipótesis nula 1*: Al estudiar los dos tipos de defecto (experimental y control) no se encontraran diferencias significativas con relación a la variable de respuesta.
- *Hipótesis alterna 1*: Al estudiar los dos tipos de defecto (experimental y control) se encontraran diferencias significativas con relación a la variable de respuesta.

- *Hipótesis nula 2:* Al estudiar los dos defectos experimentales: (Matrices con PLLA / CHT y Matrices con PLLA solamente), no habrá diferencias significativas con relación a la variable de respuesta.
- *Hipótesis alterna 2:* Al estudiar los dos defectos experimentales: (Matrices con PLLA / CHT y Matrices con PLLA solamente), habrá diferencias significativas con relación a la variable de respuesta.

Variable de Respuesta: Biointegración del andamio y evidencia de actividad osteogénica (presencia de elementos de la matriz ósea extracelular).

Adicionalmente se realizó un análisis morfométrico para comparar los porcentajes de formación de tejido óseo en las zonas injertadas, para lo cual se planteó como hipótesis:

- *Hipótesis nula 3:* Los porcentajes de formación ósea serán similares para los 4 tipos de matrices (Rígidas con y sin quitosano, Flexibles con o sin quitosano)
- *Hipótesis alterna 3:* Se encontrarán diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de formación ósea para los 4 tipos de matrices (Rígidas con y sin quitosano, Flexibles con o sin quitosano)

Las imágenes obtenidas mediante las diferentes pruebas realizadas fueron estudiadas, cuantificadas y analizadas con los software AutoCAD civil 3D 2012 e IMAGE J; para el análisis estadístico de la morfometría se diseñó un modelo de Regresión logística con el fin de estimar la Razón de disparidad (OR) (Anexo 1) y una comparación de promedios utilizando el software estadístico R versión 3.2.3. (Anexo 2)

Esta investigación fue revisada, avalada y supervisada por el comité de ética animal de la Universidad del Valle en Cali, Colombia. (Anexos 3 y 4)

3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterización preliminar de los andamios poliméricos

Una vez obtenidos los dos tipos de andamios, se realizaron análisis preliminares para determinar si las características estructurales y de superficie, estaban acordes con lo recomendado en la literatura científica para este tipo de dispositivos.

3.1.1 Caracterización mediante microscopia electrónica de barrido

Con el fin de conocer los detalles morfológicos de los andamios, se obtuvieron imágenes en un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL, modelo JSM 6490LV. La caracterización de las muestras permitió establecer la morfología, uniformidad, y distribución de los poros, para su posterior análisis. Ejemplo de ello

se ilustra en la Figura 10, en donde se observa las micrografías de los andamios rígidos con poros conformados a partir de partículas de sal, con un tamaño máximo de 74 micras, dispersos en toda la matriz polimérica.

En las imágenes de todos los dispositivos se observó que los poros estaban interconectados debido a que las paredes que forman las cavidades son discontinuas.

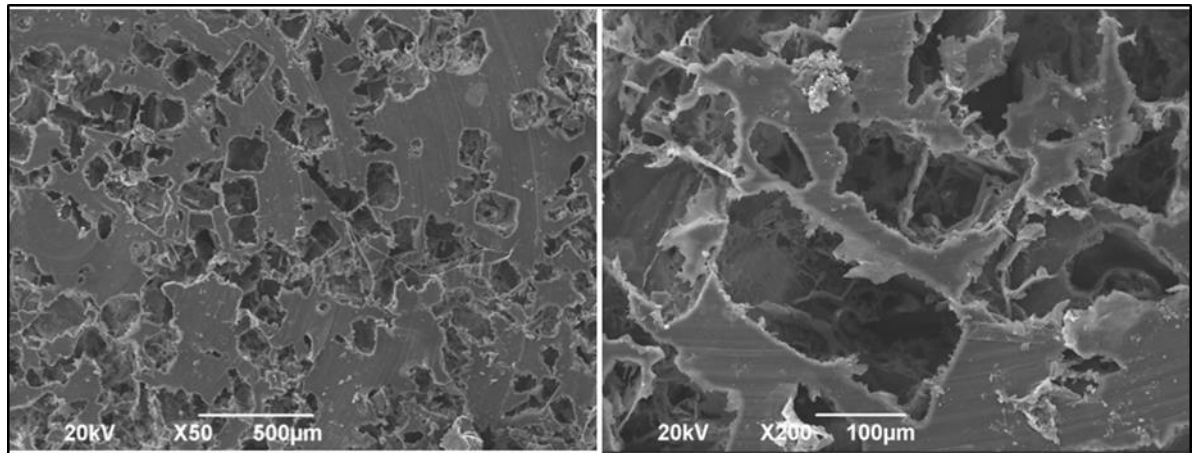


Fig.10 Morfología de andamios rígidos, se aprecia a 50x la distribución de los poros y a mayor aumento su interconectividad e irregularidad. Técnica SEM. 2015.

La Figura 11 muestra andamios flexibles obtenidas por electrohilado, con y sin quitosano, se aprecia la distribución irregular de las fibras, su morfología, la microestructura superficial porosa y la existencia de espacios entre ellas; llama la atención la presencia de ranuras en las fibras coaxiales (fibras de PLLA con una cubierta externa de quitosano), lo cual se puede explicar porque al aumentar la cantidad de PLLA algunas fibras incrementan su diámetro, mientras que el flujo del CHT es constante (0.6 ml/min) y no alcanza a recubrir toda la superficie de la fibra.

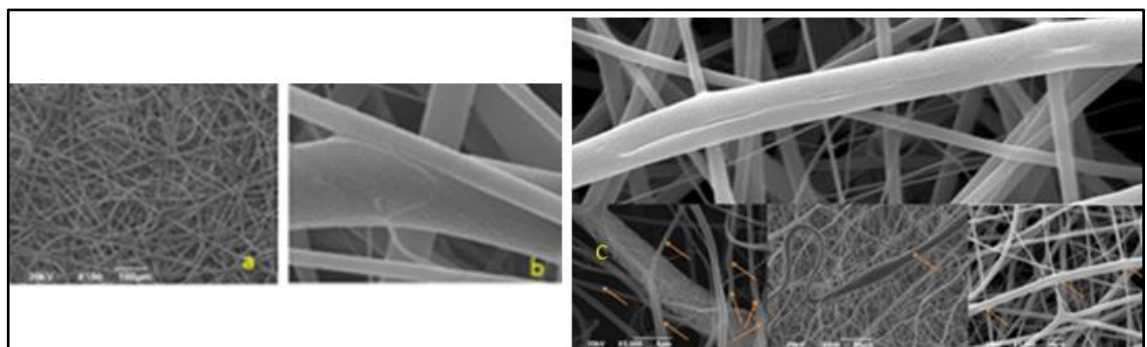


Fig. 11 Andamios flexibles. Las imágenes a y b corresponden a andamios sin quitosano y la c a las fibras obtenidas con técnica coaxial. Técnica SEM. 2015.

3.1.2 Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR):

La prueba realizada en el FTIR permitió establecer la presencia del Quitosano en aquellas muestras inmersas en él. En la Figura 12, correspondiente a un andamio rígido, se destaca el grupo carbonilo a 1751,36 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), cuyo pico está comprendido en la región de 1905-1550 cm^{-1} característico de este compuesto. Otro pico que se aprecia es 2947,23 que es característico de compuestos aldehídos (CH_3), cuyo rango está comprendido entre 3000-2700 cm^{-1} . Dichos picos corresponden a la presencia del ácido poliláctico en el andamio (43).

También se puede apreciar una amina, con presencia del grupo funcional N-H , en el pico de 2997,38, que se puede asemejar su formación ya que su región comprende los 3750-3000 cm^{-1} . Adicionalmente se puede observar el grupo funcional C-N en los picos que abarca la región 1000-1250 cm^{-1} y la presencia de C-H en 2870-2912 cm^{-1} , por todo lo anterior se pudo establecer que el CHT se adhiere a los andamios ya que todos los difracto gramas fueron idénticos (43).

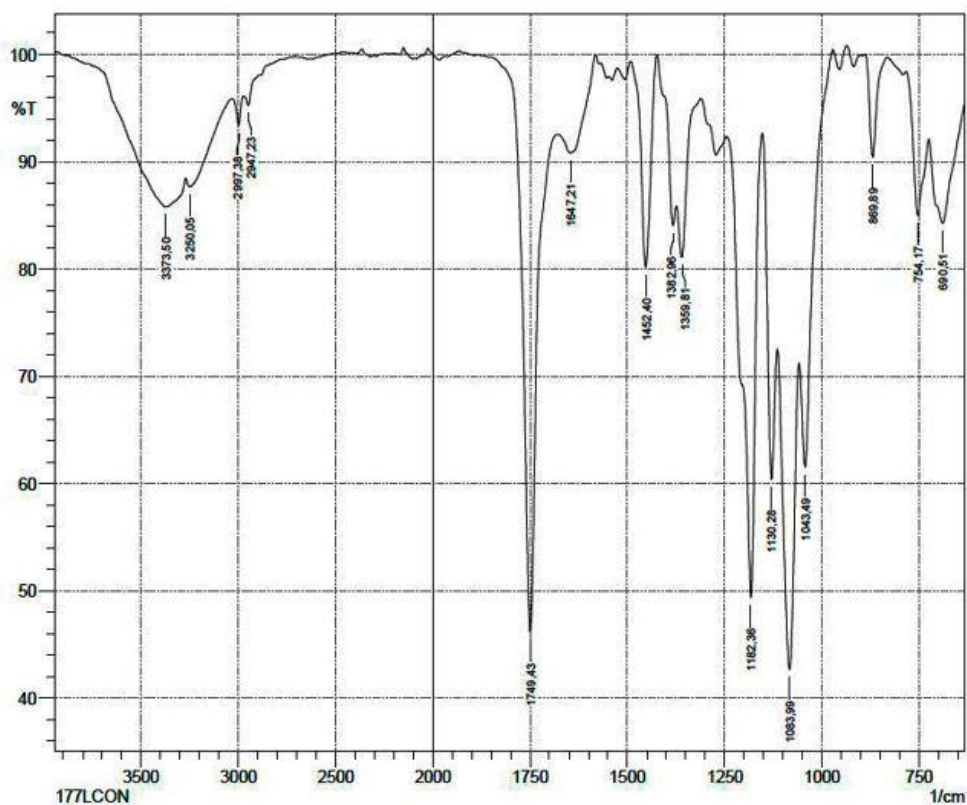


Fig. 12 Espectro de un andamio Rígido con CHT

En el caso de las matrices flexibles por técnica coaxial, la prueba realizada en el FTIR permitió establecer la presencia del quitosano en aquellas fibras electrohiladas de manera coaxial, como se observa en la Figura 13, en la que aparecen bandas características del ácido poliláctico y del quitosano; entre ellas se destaca la del carbonilo a 1751,36 cm⁻¹ (C=O), cuyo pico está comprendido en la región de 1905-1550 cm⁻¹ que es característico de este compuesto.

Otros picos de gran importancia, se pueden observar a 2875,86 y 2945,3 cm⁻¹ que son muy característicos de compuestos aldehídos (CH₃), cuyo rango está comprendido entre 3000-2700 cm⁻¹. Dichos picos corresponden a presencia del ácido poliláctico en la fibra, por lo anterior se concluye que los especímenes de PLLA contienen Quitosano (43).

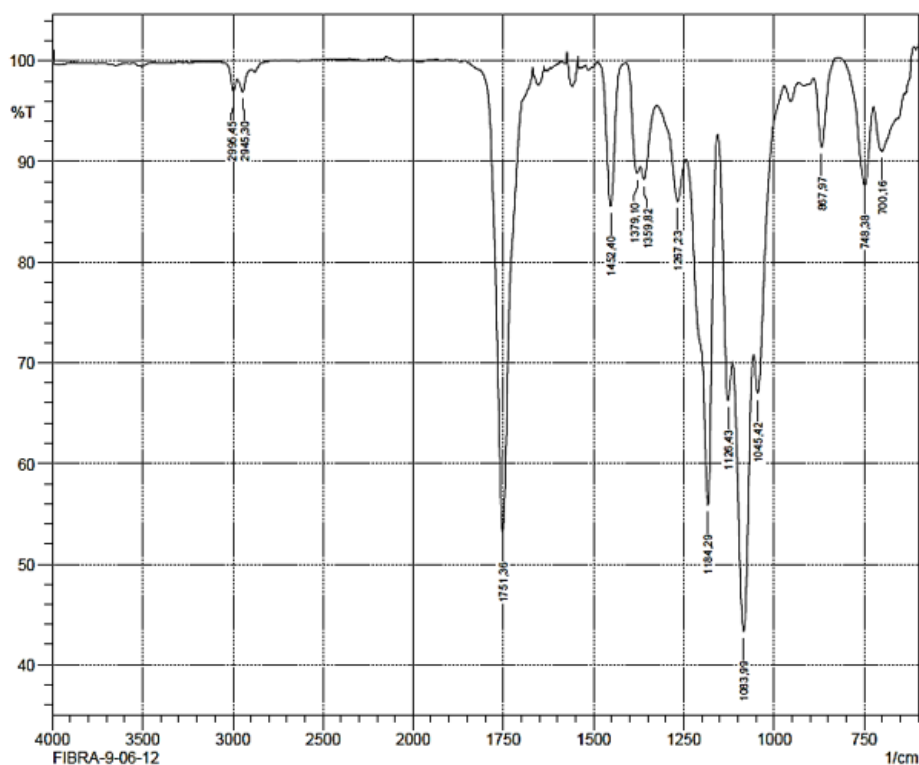


Fig. 13 Espectro de un andamio flexible coaxial

3.1.3 Pérdida de Masa (Degradación Hidrolítica):

Esta prueba fue planteada para determinar el porcentaje de pérdida de masa, como indicativo de degradación de la matriz, se realizaron ensayos de gravimetría, para los cuales se consideraron los datos de peso inicial (W₀) de las muestras antes de su inmersión en la solución salina, así como también los valores de los pesos húmedos (W_{tp}) (43).

Cada muestra fue introducida en un pozo cubierto de solución salina, para ser introducidos en una cámara climática que mantiene una temperatura aproximadamente constante de 37°C. Los datos fueron registrados cada 2 días y se calculó con la ecuación 1:

$$\text{Pérdida de masa} = \frac{(W_o - W_{tp})}{W_o} \times 100 \quad (1)$$

El comportamiento de la degradación fue similar en todos los casos y se caracterizó por una degradación lenta con pérdida de masa muy alta en los primeros días, lo cual se explica por el ataque inicial a la porción amorfa, pero siendo influenciado también por porcentaje de porosidad, tamaño de poros y grosor de los tabiques. Al comparar la degradación en muestras con y sin CHT, (Figura 14).

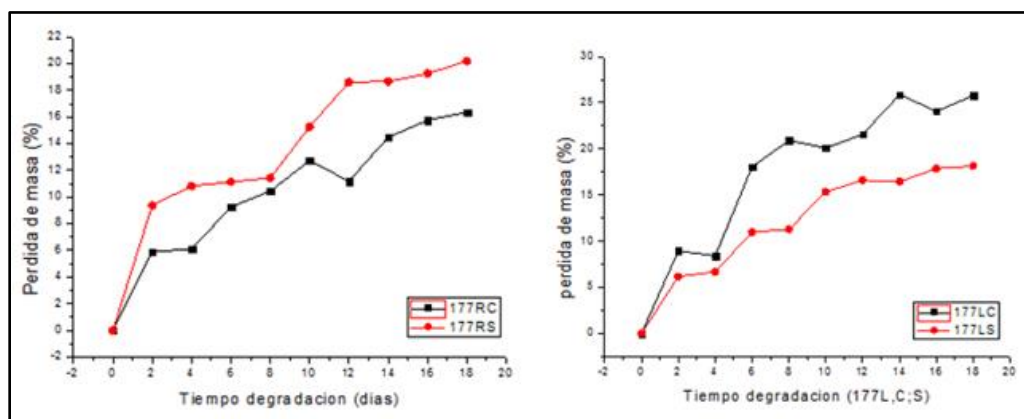


Fig. 14 Comparación del porcentaje de degradación de muestras con y sin quitosano

Determinación de la porosidad:

La porosidad se determinó midiendo la masa (M) y calculando el volumen (V), con la ayuda de un micrómetro (Fowler ®), de acuerdo a la siguiente formula (43):

$$\text{Porcentaje de Porosidad} = \frac{V_m - V_p}{V_m} \times 100 = \frac{V_{m - (\frac{M}{\rho})}}{V_m} \quad (2)$$

Las pruebas realizadas mostraron una porosidad promedio del 65% para los andamios rígidos

Determinación del peso molecular:

El peso molecular para el PLLA fue determinado como de 63.000 g/mol y para el quitosano de 20.000 g/mol, mediante técnica de viscosimetría (43).

Características de superficie

Cuando se diseña un andamio, sus características superficiales deben ser similares al del tejido que se quiere formar; la porción cortical de los huesos craneales de la Rata Wistar presentan como característica importante presentar poros de tamaño reducido y no formar sistema Haversiano,(44), tal como se puede apreciar en las Figuras 15 y 16.

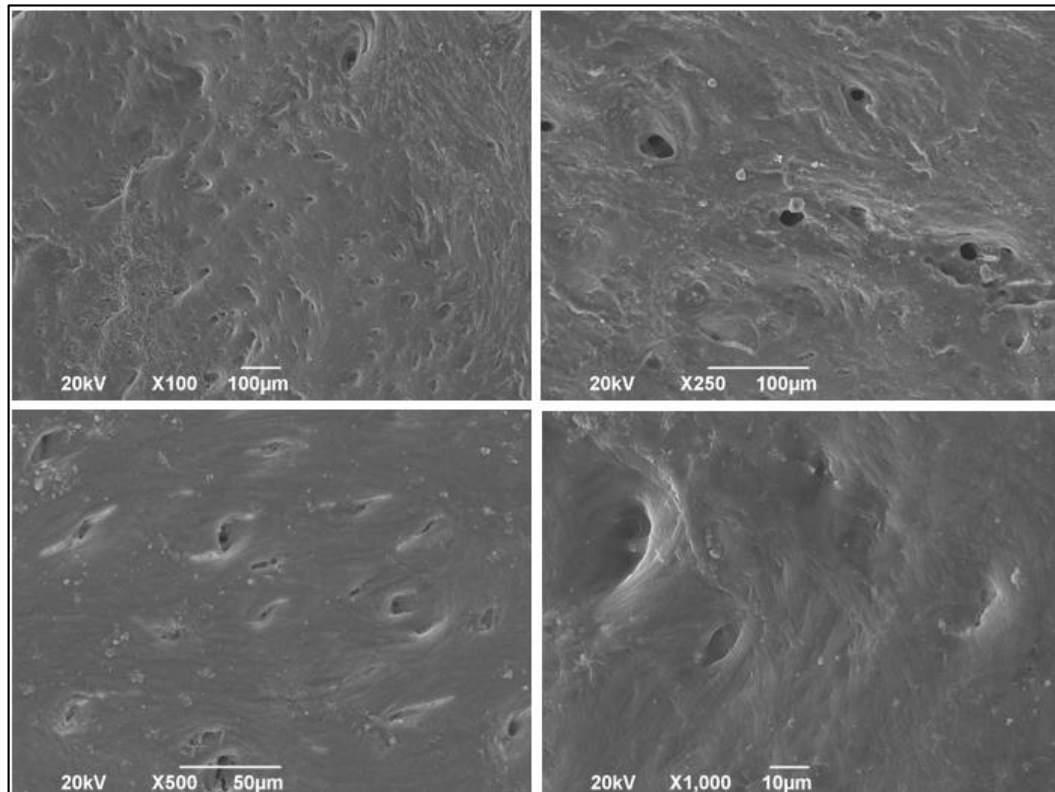


Fig. 15. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta, se aprecia la poca cantidad de poros y la ausencia de osteonas. Técnica SEM. 2015

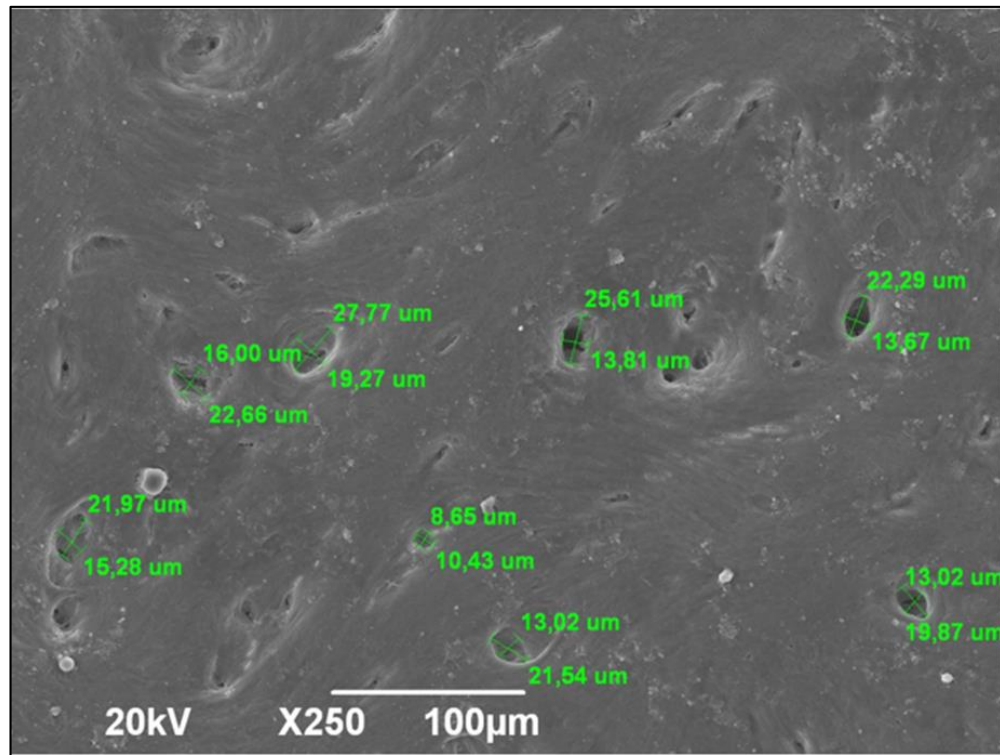


Fig. 16. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta, se puede apreciar el tamaño reducido de los poros. Técnica SEM / EDS. 2015

Las imágenes tomadas mediante SEM muestran que los andamios rígidos presentan una textura superficial caracterizada por un gran número de poros irregulares interconectados, lo cual es una característica deseada para este tipo de dispositivos, (1), (16), para Costantine M, et al, (2016) (45) el porcentaje de porosidad, el tamaño de poro y la interconectividad de los mismos se relacionan directamente con la distribución celular y son variables críticas en la elaboración de los andamios. Estas tres características se lograron incorporar a la geometría de los andamios rígidos como se puede apreciar en la figura 17 con el fin de garantizar unas buenas condiciones de adhesión y crecimiento a los osteoblastos, permitiendo además la difusión adecuada de fluidos hacia el interior del andamio.

En la literatura especializada no parece haber un acuerdo sobre el tamaño ideal de poro para construir los andamios. Lou, Z; et al (2016), (46). Recomendán un tamaño de poro en un rango de 10 a 1000 µm; otros autores reportan buenos resultados con rangos de 200 a 400 µm (46); para Tang W; et al (47), un tamaño de poro mayor a 100 µm es prerequisite para la neo formación ósea.

En el diseño realizado para esta investigación se prefirió obtener poros de tamaño mediano, en un rango de 70 a 250 µm lo cual está de acuerdo con lo reportado en la literatura (Figura 17), lo cual debería garantizar la colonización celular teniendo en cuenta que el porcentaje de porosidad está por encima del 65% y con una

interconectividad muy alta como se puede observar en los estudios con microscopia electrónica (SEM) (Imágenes 10 y 17).

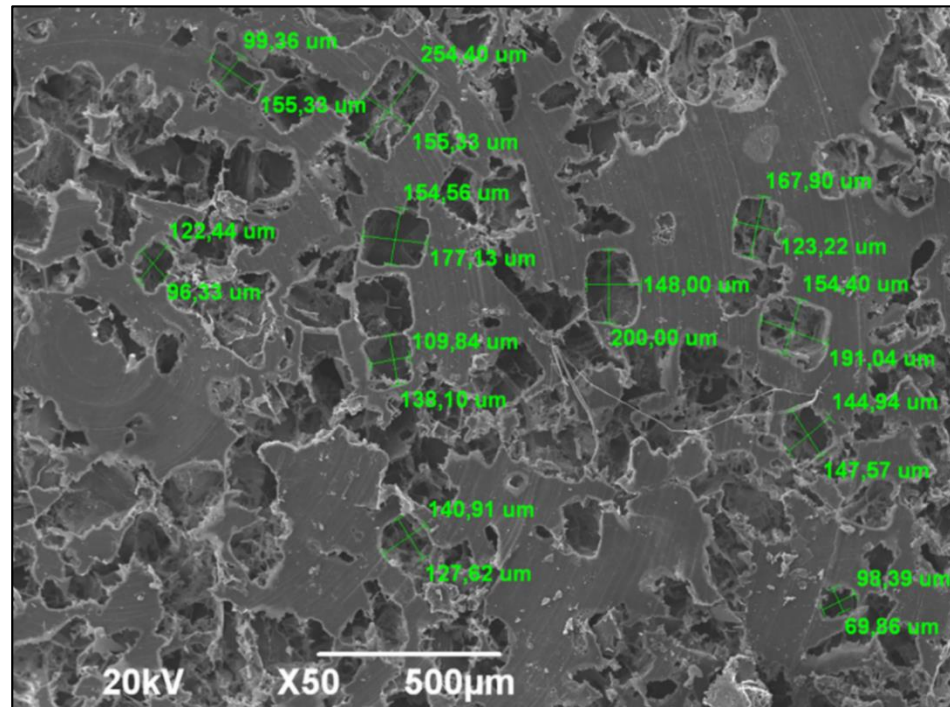


Fig. 17. Andamio rígido de PLA con CHT, Se aprecia el tamaño mediano de los poros. Técnica SEM. UNIVALLE. 2015

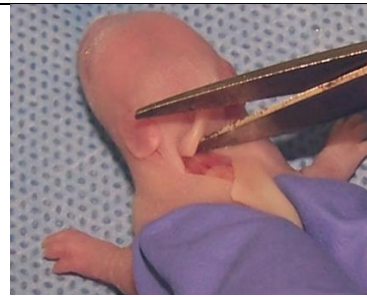
3.2 Obtención y caracterización de un cultivo primario de osteoblastos

3.2.1 Aislamiento de osteoblastos

De acuerdo a la propuesta de Bakker, A. & Klein-Nulend, J. 2012. (48), se procedió a obtener los explantes de huesos craneales de Ratas Wistar de 5 días de edad (Figuras 18 a 31).



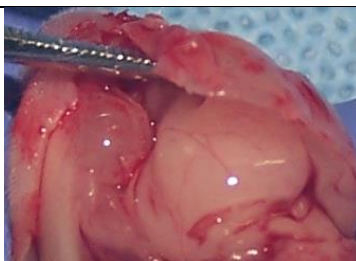
Fig. 18. Biomodelo de 5 días de edad



Figuras 19 y 20. incisión y separación tejidos blandos



Figs. 20, 21 y 22. Exposición de huesos craneales



Figs. 23,24 y 25. Disección de huesos de interés



Los explantes óseos obtenidos se lavaron con PBS estéril suplementados con antibióticos y se transportaron al laboratorio de cultivos celulares en frasco estéril, sellado, con medio osteogénico completo (cCM).

Para aislar los osteoblastos se procedió al aislamiento de las células, según el siguiente protocolo, (adaptado de Baker, A. & Klein-Nulend, J. 2012 (48).

PROTOCOLO OBTENCIÓN DE OSTEOLASTOS			
	PROCEDIMIENTO	MEDIO	TIEMPO
1.	Obtención de explantes y lavado	PBS estéril	
2.	Remoción de periostio, tejidos blandos y lavado	PBS estéril	
3.	Almacenamiento y transporte	cCM	
4.	Primera digestión	4 mL Colagenasa II	30 Minutos
5.	Segunda digestión	4 mL Colagenasa II	30 Minutos
6.	Tercera digestión	4 mL tripsina (0,10% EDTA)	30 Minutos
7.	Inhibición de la Colagenasa	4 mL cCM	Lavar 3 veces
8.	Incubación	3mL cCM	Cambio de medio cada tres días

Después de 10 días se obtuvo la primera confluencia con una población calculada de 450.000 células, (Fig. 32):

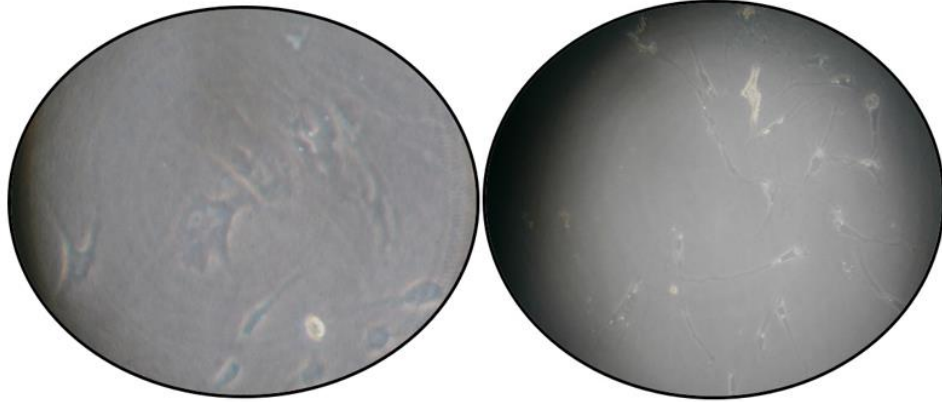


Fig. 32. Observación de la primera confluencia, con un cálculo aproximado de 450.000 células según el recuento en cámara de conteo. Microscopio de campo invertido.

Después de la primera confluencia se resembraron las células en varios frascos de cultivo y a los 12 días se obtuvo una nueva confluencia con un estimado de 7.500.000 células (Fig. 33), lo que muestra que el protocolo utilizado fue adecuado para obtener la células.

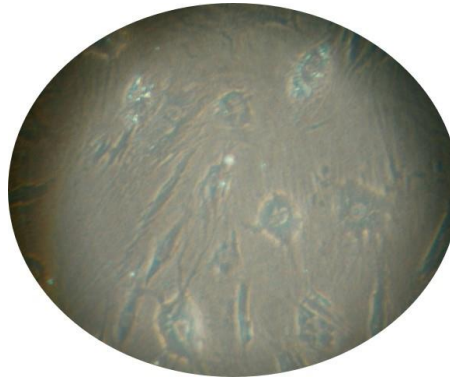


Fig. 33. Cultivo de osteoblastos murinos en segunda confluencia

3.2.2. Fenotipificación

Para verificar que las células obtenidas correspondieran a osteoblastos, se realizó un ensayo de fenotipificación a partir de la determinación de la expresión de Fosfatasa alcalina (Fa), Osteocalcina (Oc) y Osteoprotegerina (Op); con este fin se sembraron grupos de células en 1 caja de cultivo con cámaras de 8 celdas, en una densidad aproximada de 20.000 células en 300 μ L de medio de cultivo completo, en cámara de CO₂ las cuales se incubaron con anticuerpos primarios

para Fosfatasa alcalina, Osteocalcina y Osteoprotegerina, todos de origen Goat (anti mouse), (Fig. 34); como anticuerpo secundario Alexa flúor 633, origen *Donkey* (*Anti Goat*) y como marcador nuclear DAPI.

En la fila superior se depositaron los anticuerpos primarios específicos, en la fila inferior no se aplicó anticuerpo primario, solo el secundario.

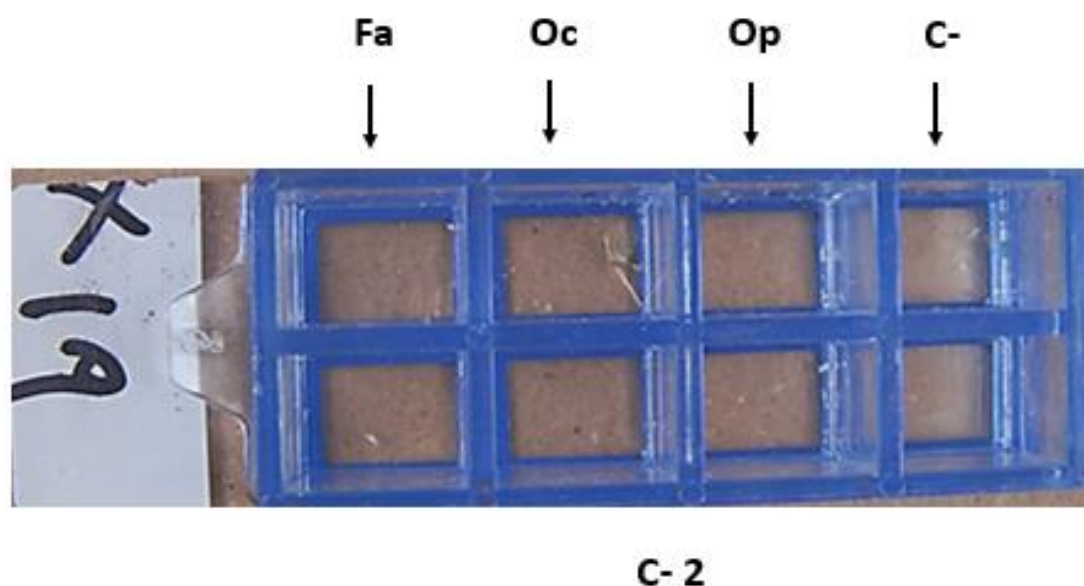
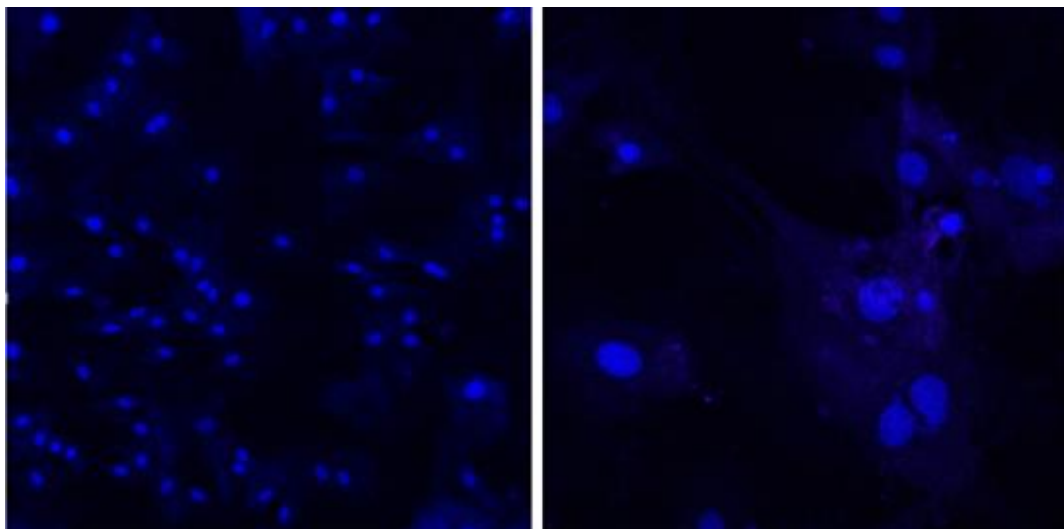


Fig. 34. Láminas de cultivo de 8 cámaras con las células sembradas; Fa: Fosfatasa alcalina, Oc: Osteocalcina, Op: Osteoprotegerina, C-: Control (cámara sin anticuerpo primario ni secundario), C-2 cámaras sin anticuerpo primario.

Para la incubación de los anticuerpos se siguió el protocolo propuesto por IHC Products & Protocol Guide. R&D Systems Tools for Cell Biology Research™, disponible en: http://www.ihcworld.com/_protocols/general_IHC/immunoenzyme_ap.htm. (Anexo 5).

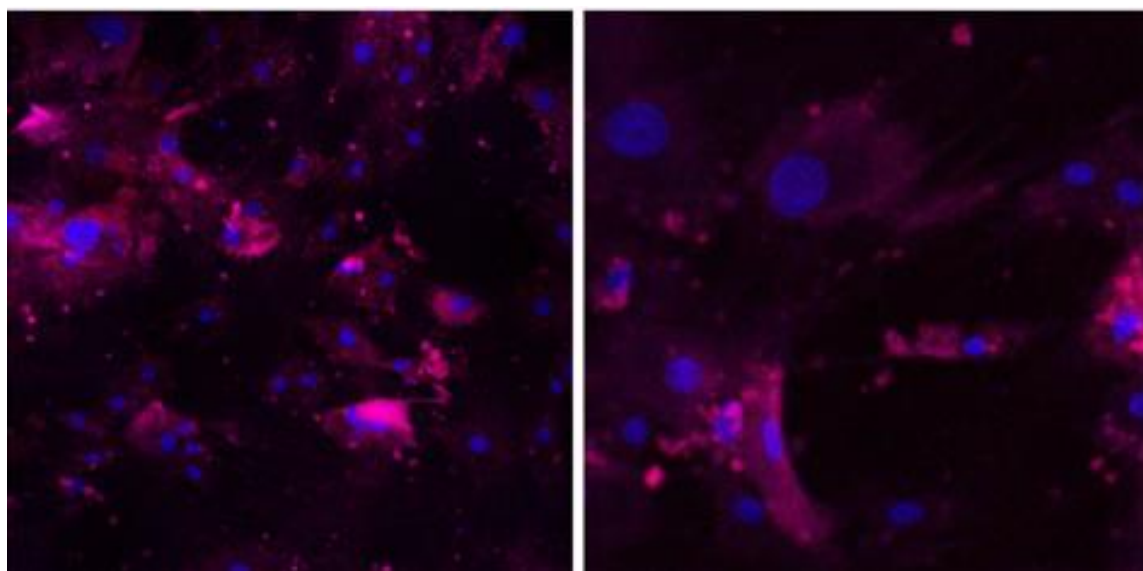
Las células fueron estudiadas mediante microscopio confocal para evaluar la expresión de los tres marcadores (Fa, Oc, Op).

Las Figuras 35 y 36 muestran la población de células que se utilizaron como control (sin anticuerpo primario).

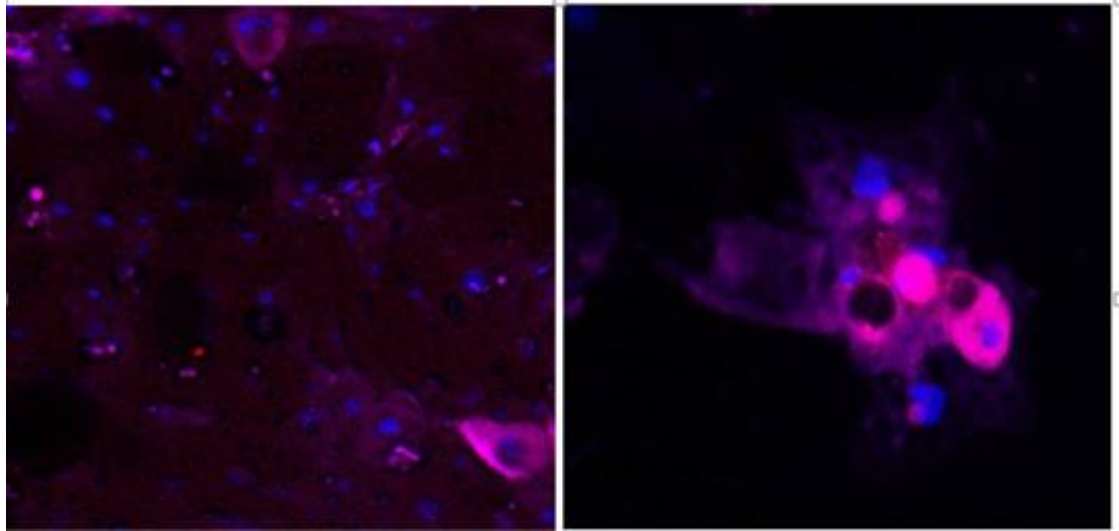


Figuras 35 y 36. Control negativo. Población de células marcadas con DAPI y Alexa flúor 633. A 10X y 20X. Microscopio Confocal. 2014

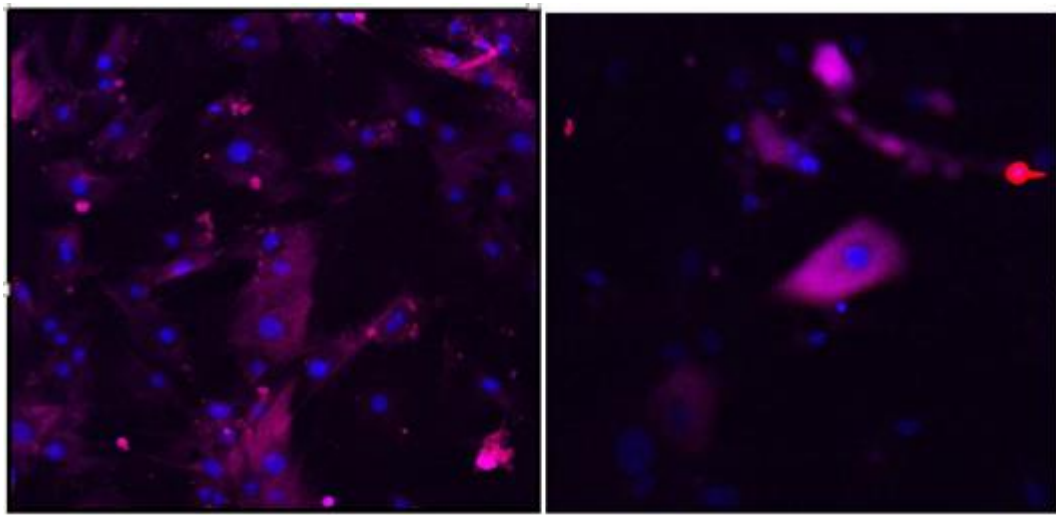
Las células marcadas para fosfatasa alcalina presentaron un 100% de tinción positiva para esta proteína (Figuras 37 y 38); la misma situación se observó al determinar la presencia de Osteocalcina (Figuras 39 y 40) y Osteoprotegerina (Figuras 41 y 42).



Figuras 37 y 38. Osteoblastos expresando Fosfatasa alcalina, (Color violeta). Alexa flúor 633. Magnificaciones a 10X y 20X. Microscopio Confocal. 2014



Figuras 39 y 40. Osteoblastos expresando Osteocalcina, (Color violeta). Alexa flúor 633. Magnificaciones a 10X y 20X. Microscopio Confocal.2014



Figuras 41 y 42. Osteoblastos expresando Osteoprotegerina, (Color violeta). Alexa flúor 633. Magnificaciones a 10X y 20X. Microscopio Confocal. UNIVALLE.2014

La fosfatasa alcalina es considerada como un marcador del fenotipo osteoblástico (49), (50), (51), (52), (53), (54) y un indicador de actividad osteogénica (55); se han

identificado cuatro isoenzimas de la fosfatasa alcalina, tres de ellas son tejido específicas como la Intestinal (IAP), la placentaria (PLAP) y la del germen celular (GCAP) y la cuarta isoenzima corresponde a la fosfatasa alcalina no específica (TNAP) presente en diversos tejidos como hueso, hígado y riñón (56).

La TNAP que se encuentra en el tejido óseo, es producida por el osteoblasto, y está presente en sus etapas tempranas de diferenciación y en su madurez cuando participa en la mineralización de la matriz extracelular (57), la concentración de esta enzima es variable, observándose su máxima expresión en el inicio de la mineralización, (54) pero disminuyendo significativamente en las etapas finales del depósito de mineral (57).

La inmunotinción tan fuerte de fosfatasa alcalina, no sólo en el interior de la célula sino también en la matriz extracelular, estaría indicando la presencia de una población osteoblástica madura, (55), (56), (57), (58), (59).

La osteocalcina (Oc) es una proteína que en el tejido óseo es producida exclusivamente por el osteoblasto (37), (59), siendo considerada un marcador de su fenotipo, (42), (52), (53), presenta una expresión alta al final de la etapa de maduración, pero sus niveles más altos se encuentran en la etapa de mineralización, (58).

La Oc actúa sobre la matriz regulando su mineralización, mediante un mecanismo controversial, ya que se propone que inhibe la precipitación de sales del calcio desde el medio extracelular sobresaturado, pero al mismo tiempo facilitaría la unión de los cristales de fosfato de calcio al colágeno en los espacios interfibrilares (59); como marcador osteogénico se considera que aparece en la etapa tardía de la diferenciación osteoblástica (60), (61).

La osteoprotegerina participa en la regulación de la osteoblastogénesis y del proceso del remodelado óseo en conjunto con el RANK ligando (42), (62), pero no se considera como un marcador específico del fenotipo osteoblástico debido a que es expresado tanto por preosteoblastos como por osteoblastos (35), (42); sin embargo su expresión simultánea con Fa y Oc en este estudio estaría indicando la presencia de una población osteoblástica madura.

3.3 Cultivo y caracterización de los andamios

Una vez verificada la presencia de una población madura de osteoblastos se procedió a sembrar las células en los andamios. Los andamios tanto rígidos como flexibles fueron depositados en cajas de cultivo de 8 celdas con 20.000 osteoblastos por celda y con medio de cultivo completo para osteoblastos (Fig. 43)

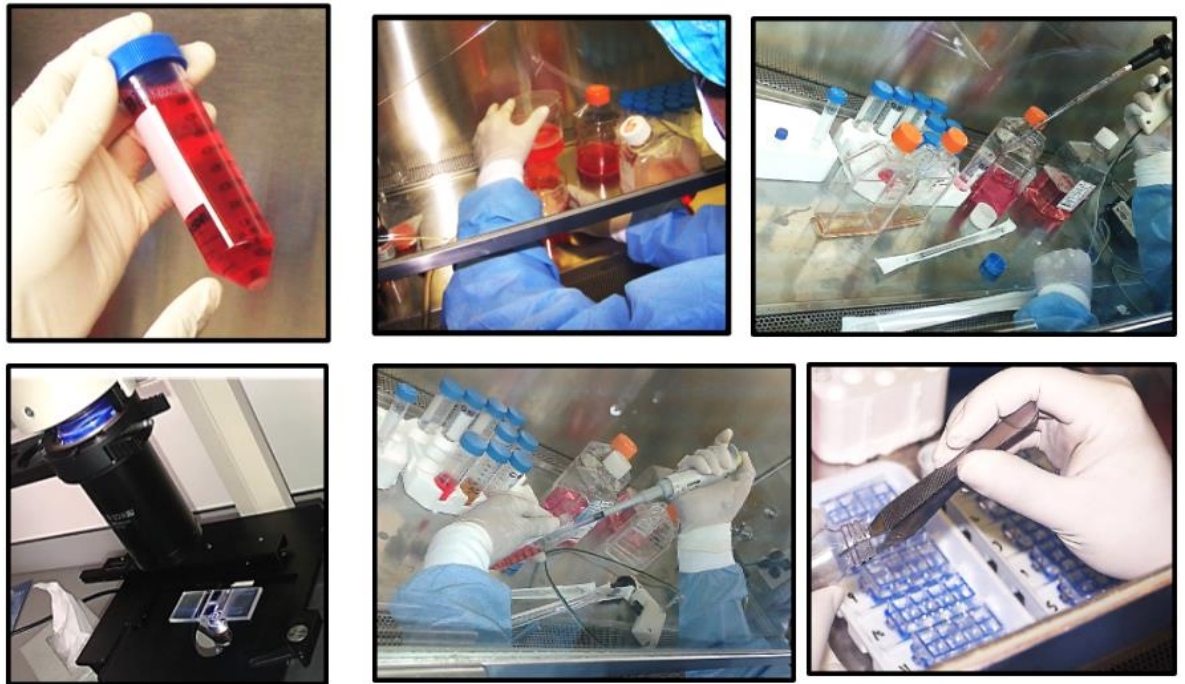


Figura. 43. Proceso de siembra de los andamios con los osteoblastos caracterizados.

Se cultivaron cuatro tipos de andamios según el esquema mostrado en la figura 44, donde B corresponde a un andamio rígido sin quitosano, C a un andamio rígido con quitosano, D a un andamio flexible con quitosano y H a un andamio flexibles sin quitosano.

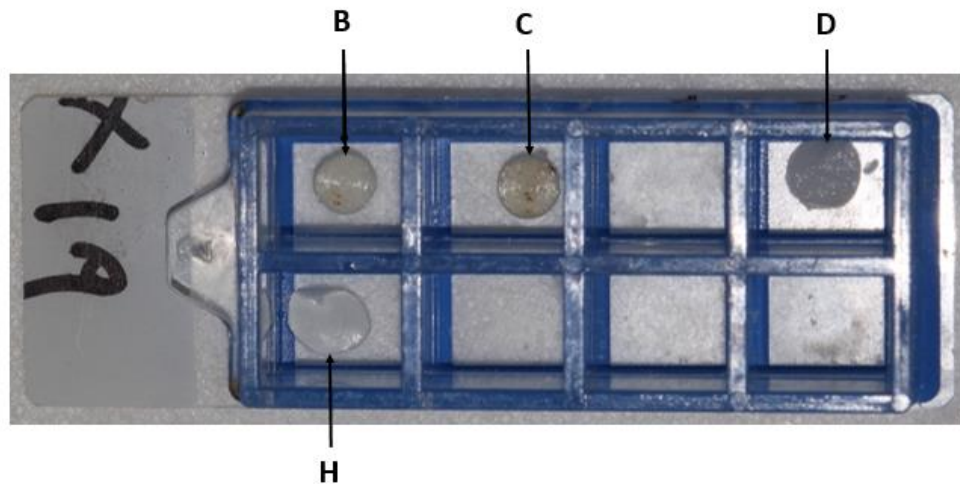


Figura. 44. Andamios de ácido poliláctico cultivados con osteoblastos, se observan los 4 tipos de andamios en sus respectivas celdas

Los andamios fueron cultivados por 15 días utilizando medio osteogénico completo (OMC Lonza ®), en cámara de incubación con CO₂, con cambio de medio cada tres días.

Después del período de cultivo de 15 días se retiraron los andamios y se tomaron microfotografías en microscopio electrónico de barrido, con el fin de evaluar los cambios en la morfología superficial y la presencia de células y componentes de la matriz extracelular, como fibras colágeno, calcio, fosforo y sílice.

Una vez retirados los andamios se procedió a realizar un nuevo estudio a las cajas de cultivo, con el fin de caracterizar los osteoblastos remanentes en el fondo de la misma, sobre la placa de vidrio.

Se realizó una caracterización preliminar para Fosfatasa alcalina y Osteocalcina utilizando microscopia confocal.

La figura 45 muestra la matriz extracelular de un cultivo de osteoblastos marcada para fosfatasa alcalina; se observa una expresión fuerte en la matriz la cual tiene formas trabeculadas que recuerdan la formación intramembranosa, los núcleos celulares fueron marcados con DAPI.

La apariencia de la matriz extracelular mostrada es de una estructura conformada por crestas y valles con presencia de poros, los osteoblastos están incorporados en la matriz, algunos son visibles por sus núcleos localizados en los poros que se han conformado (Fig. 45).

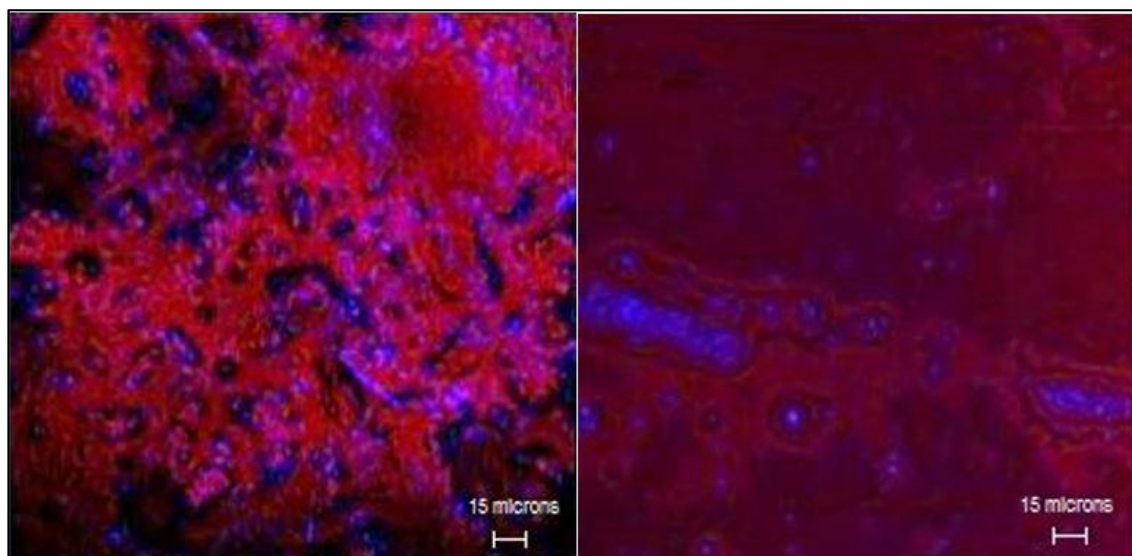


Figura 45. Matriz extracelular marcada para Fosfatasa alcalina (color rojo) los núcleos se observan de color azul. Alexa flúor 633. Magnificaciones 20X. Microscopio Confocal.

En las muestras marcadas para osteocalcina también se observa la presencia de estructuras que se asemejan a trabéculas, en la figura 46 se observa un sector de una “trabécula” que representa a la matriz extracelular (coloración rojiza), se aprecian varios poros con osteoblastos incluidos en ellos, identificables por la tinción nuclear (DAPI) de color azul.

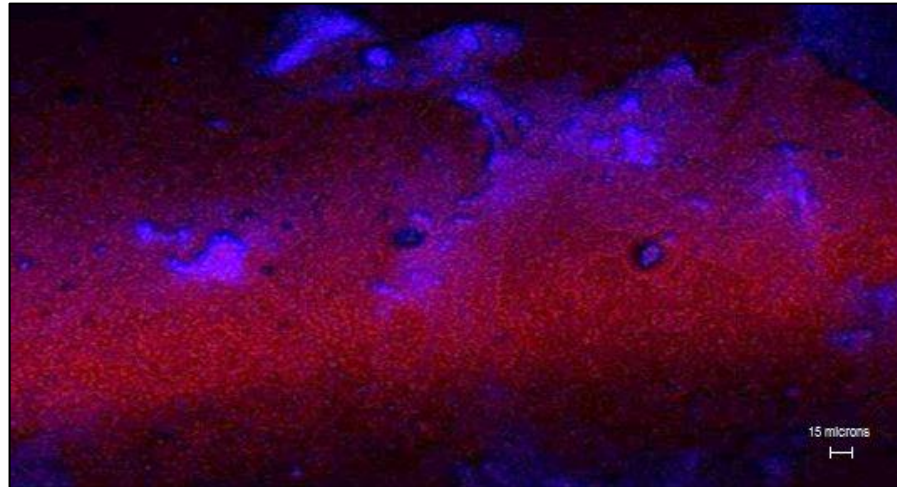


Figura 46. Matriz extracelular marcada para Fa, los núcleos se observan de color azul. Alexa flúor 633, DAPI Magnificaciones 20X. Microscopio Confocal.

La imagen 47 representa la reconstrucción obtenida a partir de 40 cortes del espesor total de un campo de observación a 10X en la capa de células y matriz extracelular depositada en el fondo de la cámara de cultivo y correspondiente al marcaje para osteocalcina.

La imagen central corresponde a un osteoblasto en el interior de un poro expresando Oc (color amarillo rojizo); la matriz extracelular se observa de color verde y en su textura superficial hay irregularidades y poros (color negro) en algunos de los cuales también hay expresión para Oc, en otras partes de la matriz (color verde) también hay expresión de la proteína; en la medida en que el corte es más profundo la marca va haciéndose más débil.

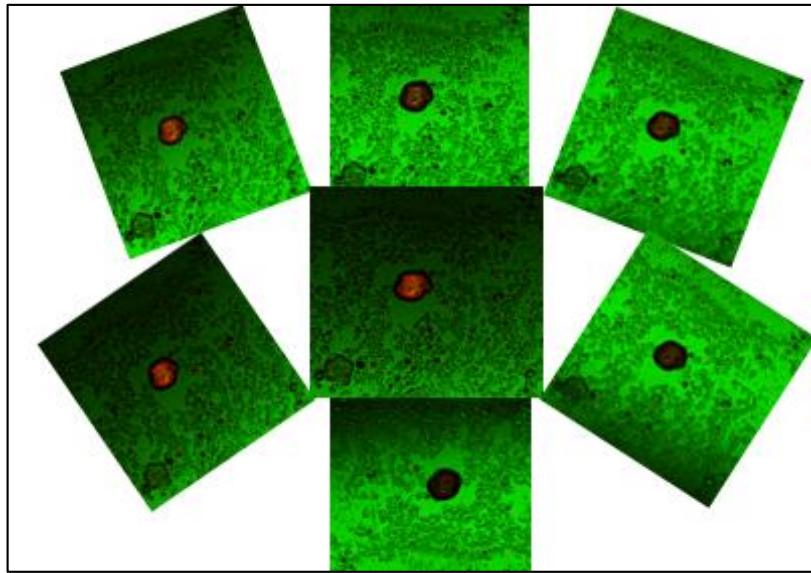


Figura 47. Matriz extracelular marcada para osteocalcina; en el centro de todas las imágenes se observa un osteoblasto marcando Oc (color rojo). Alexa flúor 633. Magnificaciones a 20X. Microscopio Confocal.

Los resultados también permitieron identificar matriz extracelular en proceso de depósito por osteoblastos; se aprecian estructuras fibrilares con depósito de material sobre ellas y con presencia de estructuras redondeadas compatibles con vesículas de matriz, también hay algunos osteoblastos asociados (Figura 48).

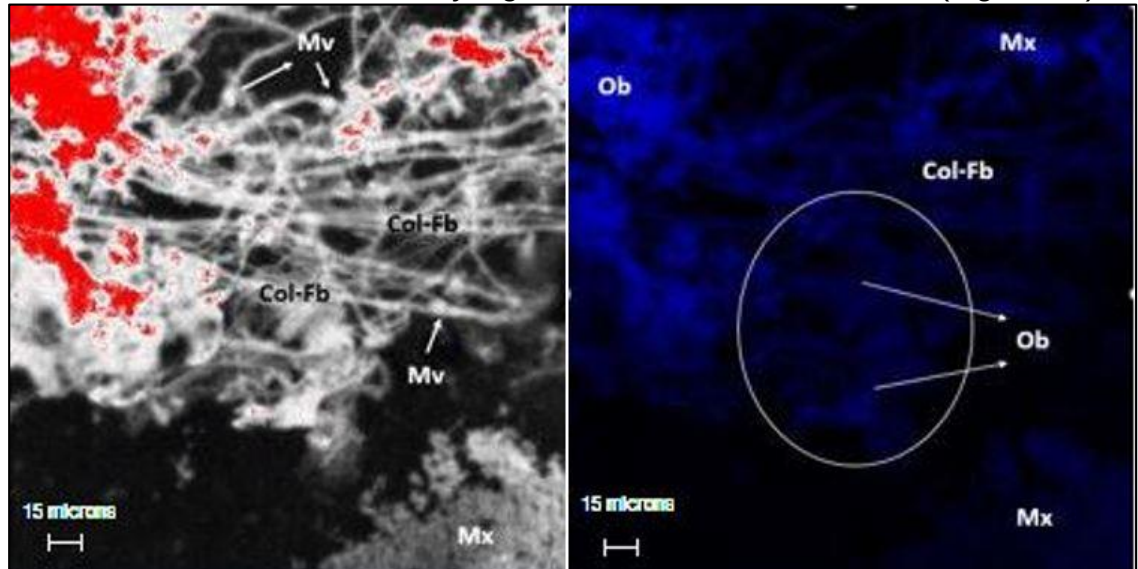


Figura 48. Matriz extracelular en un cultivo de osteoblastos a 15 días. Ob: Osteoblastos; Mx: Matrix extracelular; Col-Fb: Fibras colágeno; Mv: Vesículas de matriz. Microscopio Confocal 20X.

Para la caracterización también se utilizó el kit para inmunohistoquímica *ImmunoCruz™ goat ABC Staining System* (referencia sc-2023) y anticuerpos anti-rata de origen cabra para Fa y Oc el protocolo de tinción fue modificado a partir del propuesto por la casa fabricante (Anexos 6 y7), como contra tinción se utilizó hematoxilina de Harris por diez segundos.

Las figura 49 y 50 corresponden a ejemplos de las muestras control, se trata de una población de osteoblastos que fueron expuesto al anticuerpo secundario pero sin presencia de anticuerpo primario (Fa y Oc respectivamente), observándose el contorno de las celulas y la comunicación mediante prolongaciones citoplasmáticas y el aspecto redondeado de los núcleos, lo cual es típico de osteoblastos en cultivo.

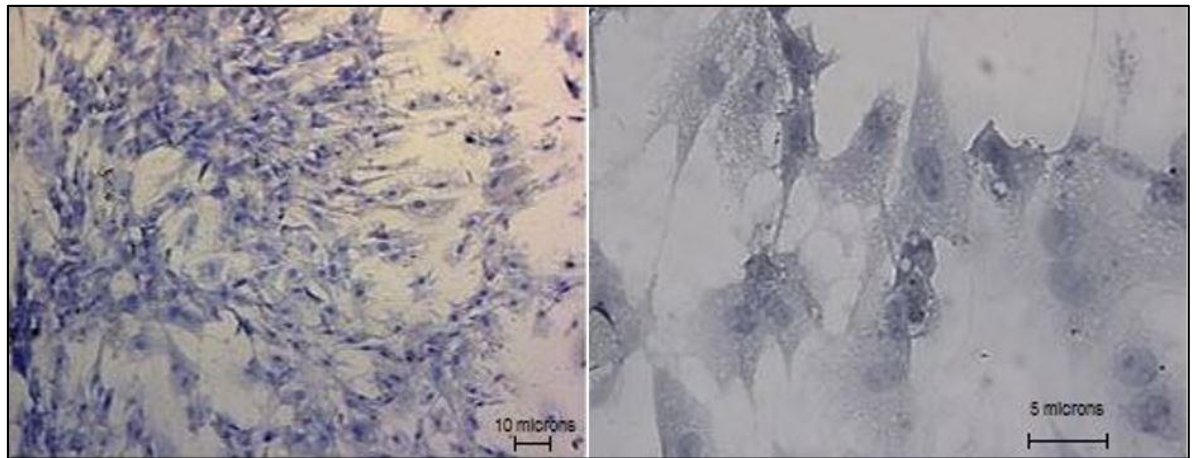


Figura 49. Osteoblastos murinos en cultivo, Control negativo para Fa. A la izquierda magnificación a 10X, a la derecha a 40X. Técnica IHQ

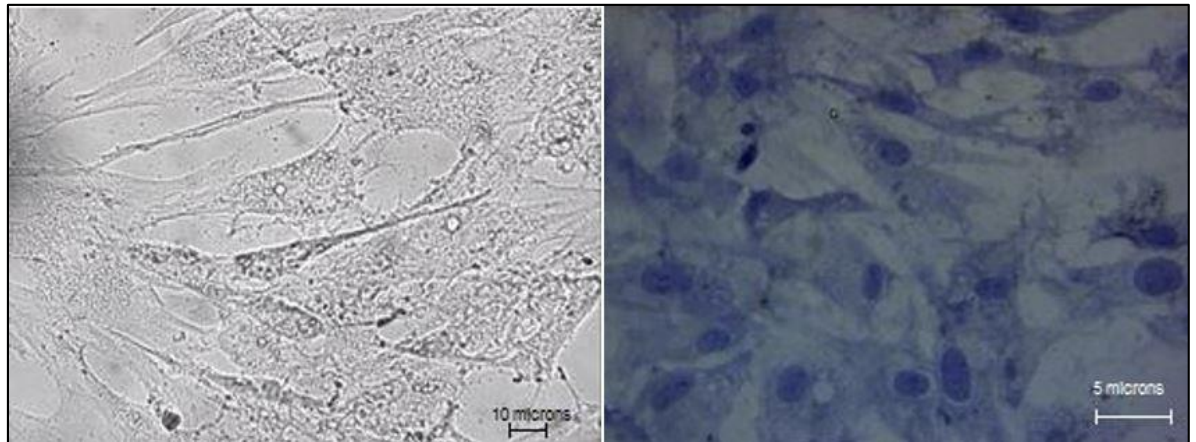


Figura 50. Osteoblastos murinos en cultivo, Control negativo para Oc. A la izquierda magnificación a 10X, a la derecha a 40X. Técnica IHQ

La figura 51 corresponde a la marcación para fosfatasa alcalina observándose una marca fuerte para esta proteína con expresión tanto intracelular como extracelular.

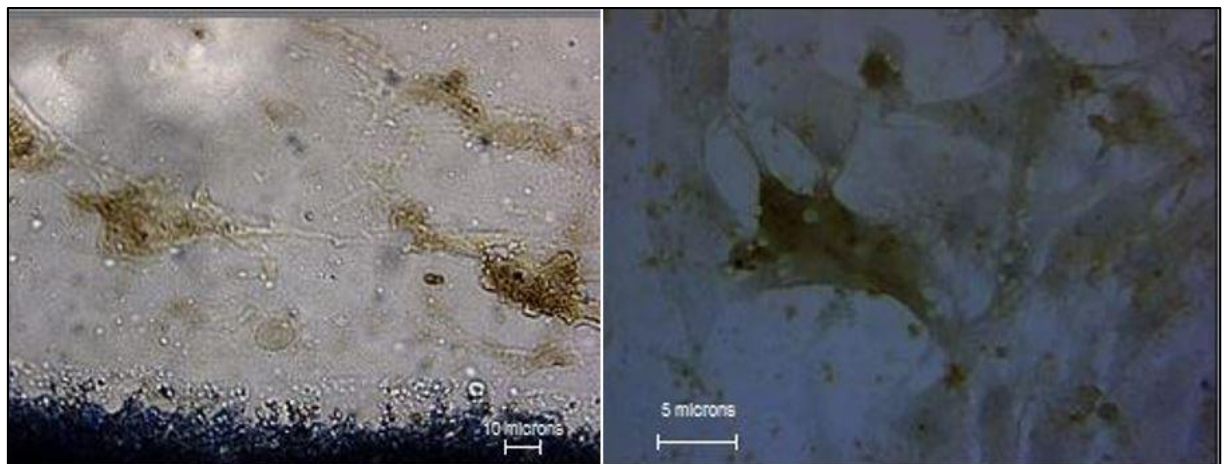


Figura 51. Osteoblastos murinos en cultivo. Tinción para Fa. I. Izquierda a 10x, derecha a 40 X. Técnica IHQ

Para el momento de la prueba (15 días de cultivo), la señal para osteocalcina parece estar incorporada en la matriz extracelular; en la figura 52 en la imagen izquierda se aprecia marcaje de la matriz y algunas formas que podrían corresponder a osteoblastos expresando la proteína, en la imagen de la derecha los osteoblastos (identificados por los núcleos redondeados teñidos de color azul) no parecen tener marca en su citoesqueleto o membrana celular y la expresión es mas de tipo extracelular, (Fig. 52).

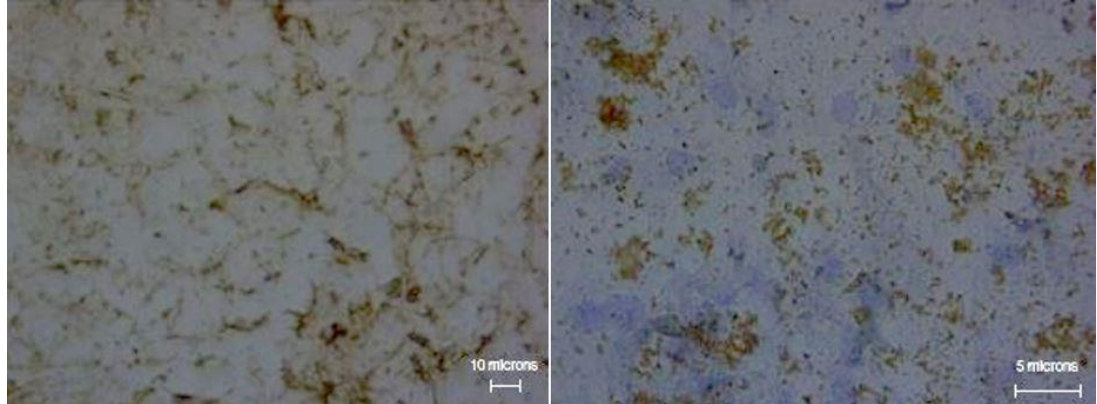


Figura 52. Osteoblastos murinos en cultivo. Tinción para Oc. A la izquierda a 20X, a la derecha a 40X. Técnica IHQ.

Las imágenes obtenidas para los osteoblastos en cultivo están de acuerdo con lo reportado en la literatura y permiten determinar la fase de producción de matriz extracelular en que se encuentran.

El desarrollo de la matriz extracelular para osteoblastos en cultivo atraviesa por tres etapas, una de proliferación, una de maduración y otra de mineralización, cada una coincidiendo con expresiones a la alta o a la baja de genes que regulan la producción de algunas proteínas específicas como el colágeno tipo I, la fosfatasa alcalina y la osteocalcina, relacionados directamente con la matriz ósea extracelular, (63).

La primera etapa del día cero al día 12, corresponde a la proliferativa, en ella hay una marcada proliferación celular y una expresión alta de los genes relacionados con la producción de colágeno tipo I, termina con un pico en el cual las células están en ascenso, la producción de Fa es aproximadamente la mitad de la expresión total y la expresión de Oc es muy baja, (63).

La segunda etapa o de Maduración va del día 12 al día 21, siendo lo más característico la detección de la máxima expresión de fosfatasa alcalina.

En la tercera etapa ocurre la mineralización de la matriz, se inicia alrededor del día 20, en esta etapa los genes que producen las proteínas reguladoras de la mineralización como la osteocalcina, la sialoproteína ósea y la osteopontina están en su expresión más alta, (63). (Fig. 53).

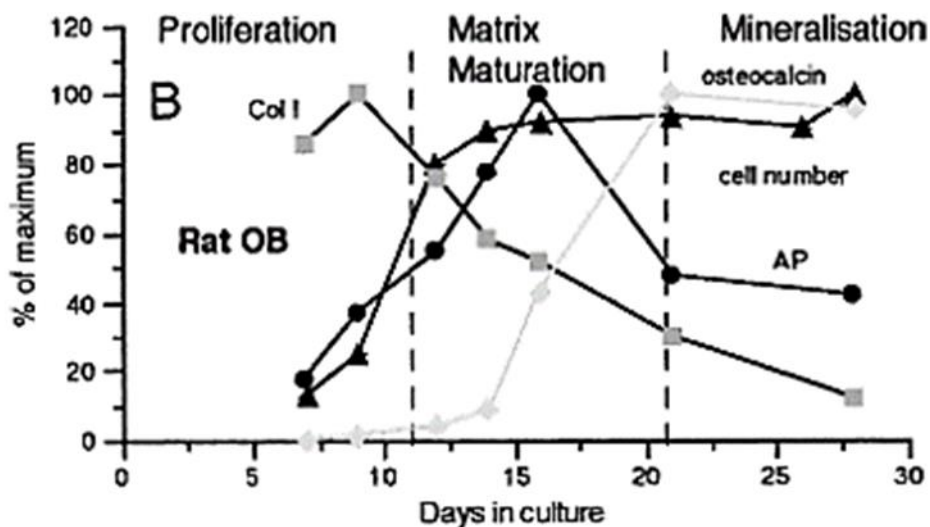


Figura. 53. Etapas de desarrollo de la matriz extracelular en Ob murinos cultivados. Col I: Colágeno I, AP: fosfatasa alcalina). Fuente: Siggelkow H, Et al. 1999.

En este estudio se encontró que a 15 días de cultivo, la población celular mostró inmunotinción positiva para los dos tipos de marcadores (Fa, Oc) lo que permitió caracterizar a las células como osteoblastos en la fase de maduración de la matriz; lo cual está de acuerdo con el trabajo clásico de Siggelkow, H; et al (2009) (63), quienes encuentran en un estudio serial de osteoblastos murinos que el pico máximo para la fosfatasa alcalina se da alrededor del día 15 (fase de maduración) y disminuye en la etapa de mineralización; mientras que la osteocalcina permanece alta en la fase de maduración pero tiene su mayor expresión en la fase de mineralización, (Fig.53).

En estudios con osteoblastos, Rosa, A & Beloti, M, (2005),(64), también encontraron en osteoblastos humanos la máxima producción de Fa alrededor del día 14 días de cultivo, coincidiendo con el inicio de la mineralización.

3.3.1 Análisis mediante microscopia electrónica de barrido (SEM):

3.3.1.1 Caracterización de los andamios rígidos cultivados (SEM):

Mediante análisis por SEM se observó que los dos tipos de andamios rígidos (con y sin quitosano) presentaron diferencias notables en su superficie.

En general en los andamios rígidos sin CHT (Fig. 54) después de 15 días todavía persisten numerosos poros y una textura que recuerda al andamio original (Figs. 10 y 17); en contraste los andamios rígidos con CHT presentan una imagen más

heterogénea con reducción de poros en cantidad y tamaño de los mismos, con depósito de material en su superficie (Fig. 56).

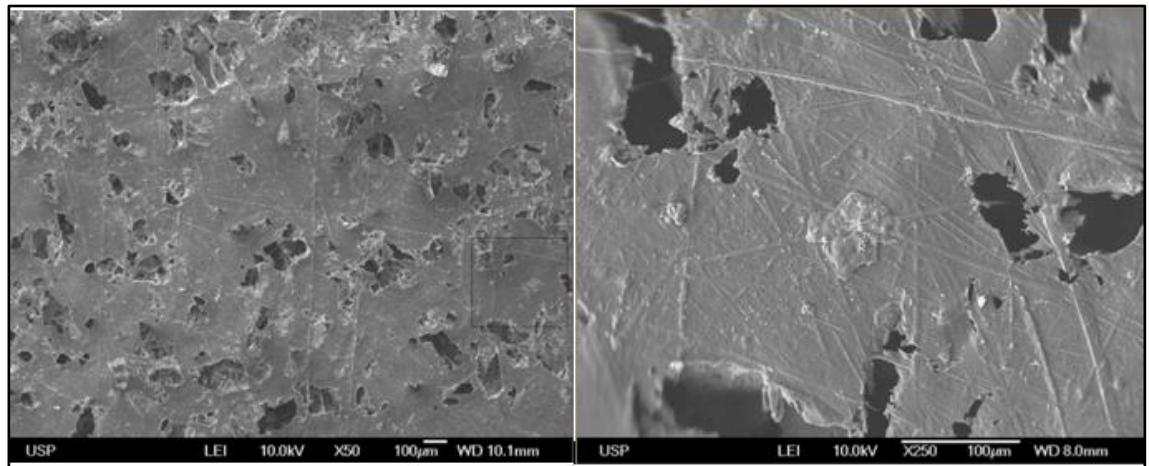


Fig.54 Andamio rígido sin quitosano. Se aprecia un andamio rígido de PLLA a 50 x y a 250 x, se observa persistencia de poros y deposito superficial de estructuras compatibles con osteoblastos y matriz extracelular. Técnica SEM.

En La Figura 55 se observa la zona el andamio rígido sin CHT donde se encuentra un grupo de osteoblastos agrupados produciendo matriz extracelular, lo cual se confirma mediante análisis elemental (EDS) algunos osteoblastos agrupados. El análisis por EDS detecta presencia de calcio, fosforo, magnesio y azufre.

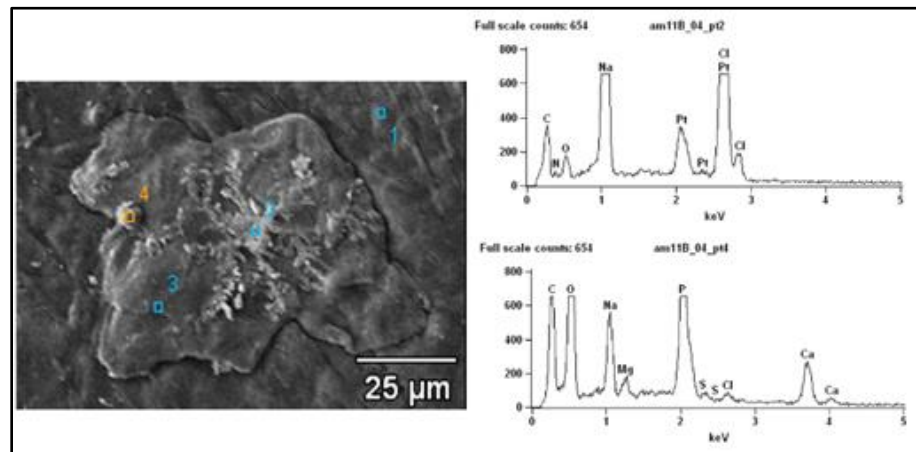


Fig. 55. Se estudia a mayor aumento un sector de la Fig. 54, observándose un grupo de osteoblastos en proceso de formación de matriz extracelular; el EDS muestra presencia de Ca, P, Mg y S. Técnica SEM / EDS.

La Figura 56 corresponde a un andamio rígido de PLLA con quitosano, la superficie presenta tres sectores más o menos identificables: Uno donde

persisten poros, asemejándose al andamio original, otro de transición donde se aprecia gran cantidad de fibras y presencia de algunos poros y un tercero donde hay abundante depósito de material con fibras embebidas donde los poros dejan de ser apreciables.

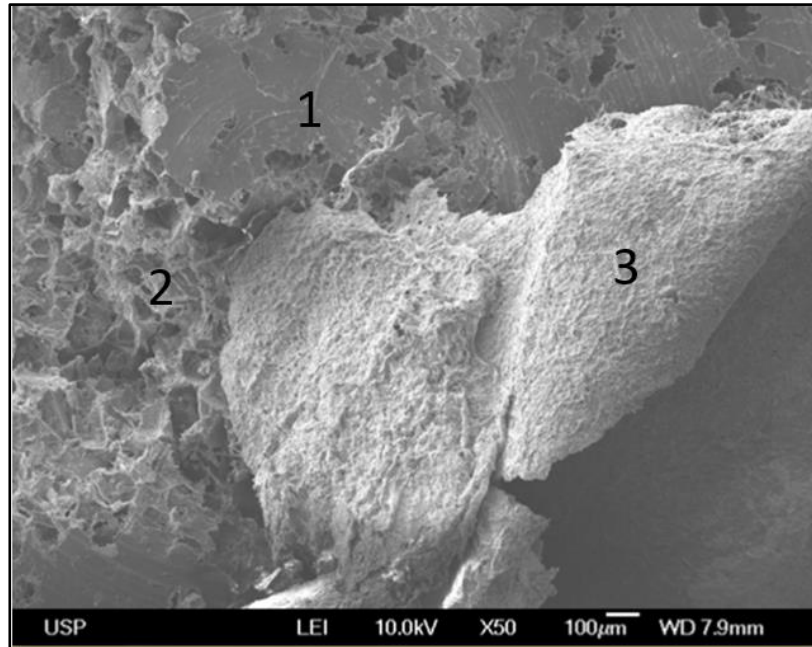


Figura 56. Andamio rígido de PLLA con CHT. Se observan los tres sectores descritos en el texto. Técnica SEM.

En el sector 1, la imagen es similar a la de los andamios de PLLA sin CHT, con presencia de poros y muy pocas células o estructuras osteogénicas, pero a mayor aumento llama la atención la presencia de una estructura reticular de CHT sobre la superficie que está sirviendo de soporte a las células; también se aprecia depósito de matriz extracelular y presencia de vesículas y micro vesículas de matriz, (Fig. 57).

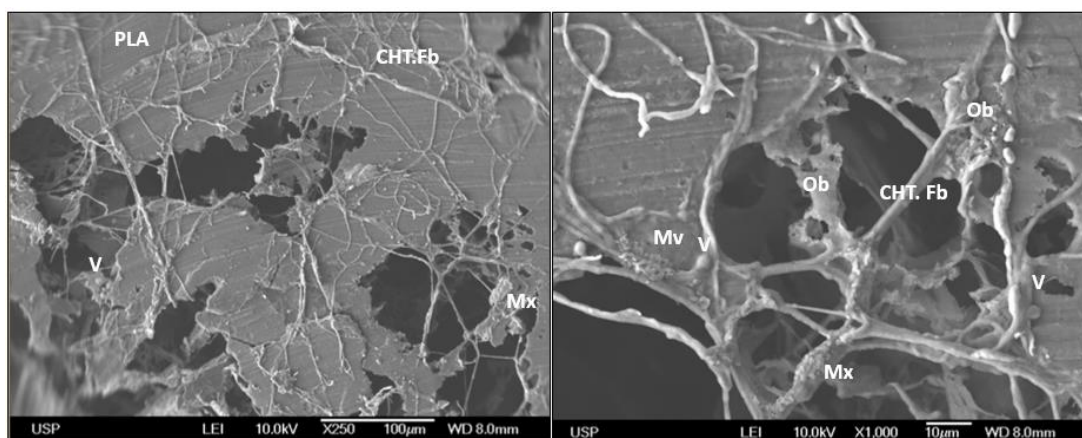


Figura 57 Andamio rígido de PLLA con CHT, Sector 1. Formación de una estructura reticular de CHT sobre el andamio. Mx): Matriz extracelular; V: Vesículas de matriz; Mv: Micro vesículas, Ob: Osteoblastos, CHT.Fb: Fibras de quitosano. Técnica SEM.

Mediante análisis con EDS se confirmó la presencia de elementos de la matriz extracelular como Ca, Si, S y Mg, en el sector 1, (Fig. 58).

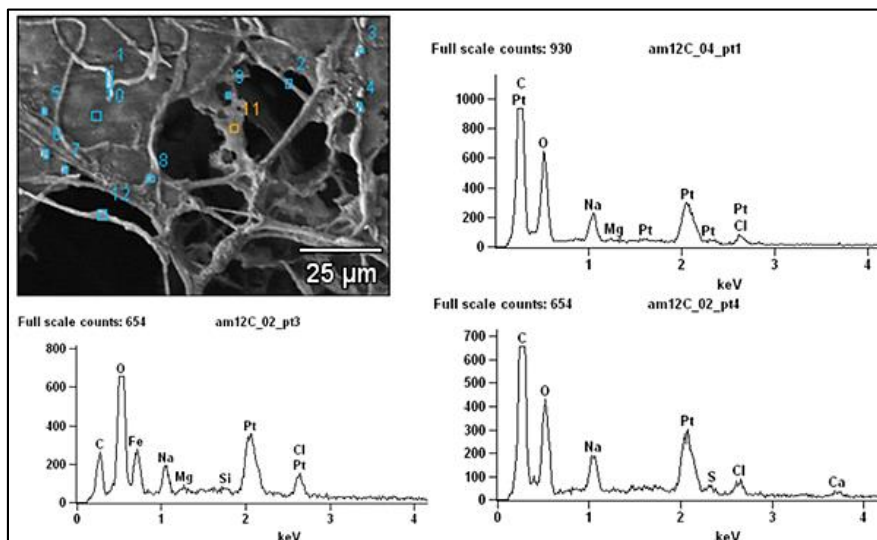


Figura 58. Andamio rígido con quitosano, sector 1. El análisis elemental indicó presencia de Mg, Si, S y Ca. Técnica SEM/EDS.

Cuando se revisaron las fibras de CHT a mayor aumento se observó la presencia de calcio y de cristales de cloruro de sodio (Fig. 59), sobre las mismas

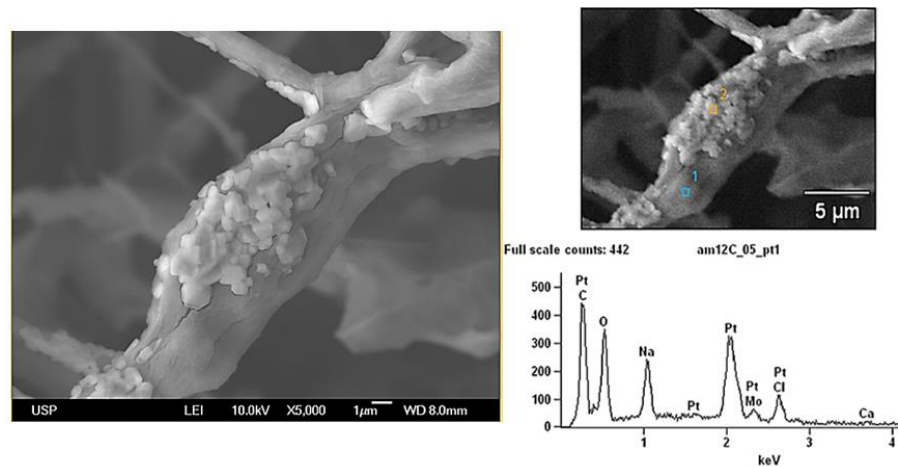


Figura 59. Fibra de Quitosano en un andamio de PLA con CHT.. Hay depósito de cristales en su superficie, El análisis elemental indica presencia de Na, Cl y Ca. Técnica SEM/ EDS.

El análisis del sector 2, muestra la presencia de numerosos osteoblastos con producción de vesículas y matriz extracelular, hay bloqueo casi completo de los poros y a diferencia del sector 1 no es identificable la estructura de ácido poliláctico (PLLA), (Fig. 60)

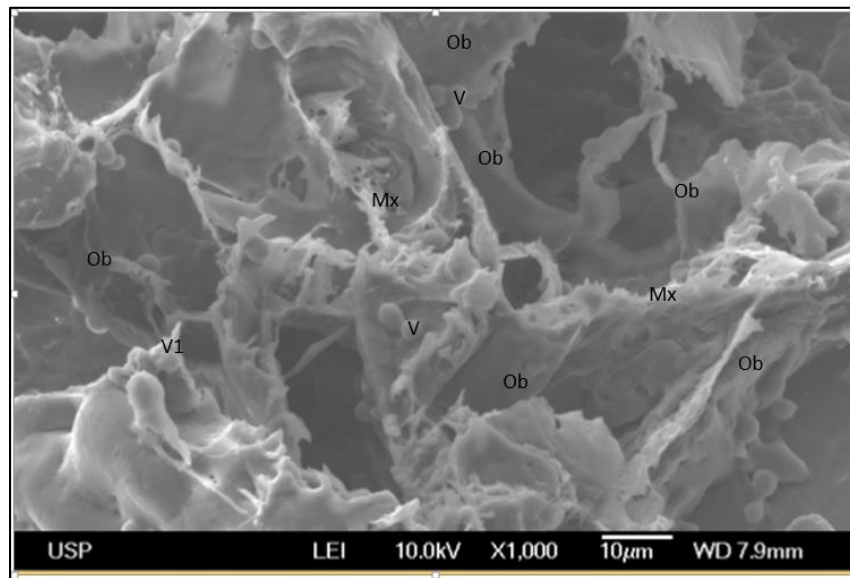


Figura 60. Andamio rígido con quitosano, sector 2. Ob; Osteoblastos; V: Vesículas; V1: Vesículas en proceso de degradación; Mx: Matriz extracelular. Técnica SEM

Al realizar a espectroscopia por EDS del sector 2 se detectó presencia de azufre y nitrógeno elementos presentes en algunas proteínas de la matriz extracelular ósea, (Fig. 61).

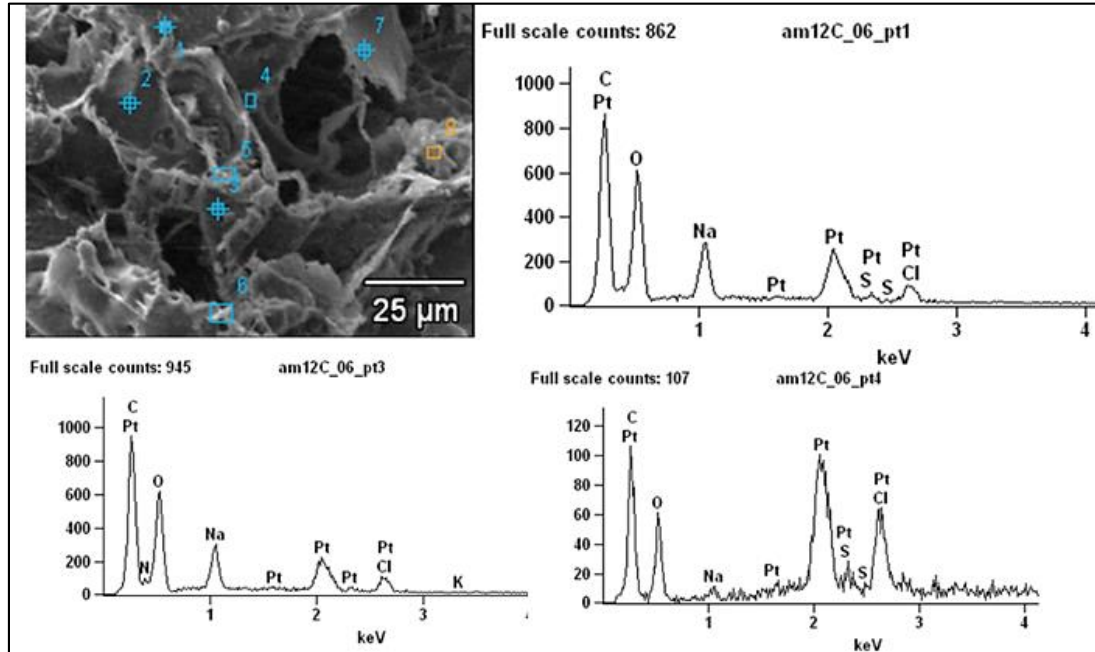


Figura 61. Análisis elemental del sector 2. Técnica SEM/EDS.

El análisis del sector 3 permite tener una idea del proceso de maduración de la matriz extracelular, ya que se puede apreciar su formación en tres etapas bien definidas.

En una primera etapa varios osteoblastos unidos entre sí por prolongaciones citoplasmáticas, se anclan a la superficie de la estructura de PLLA e inician la formación de una red de colágeno; en la etapa 2 la red se torna más densa y los osteoblastos quedan incluidos en ellas; en la etapa 3 aunque es posible observar la estructura fibrosa, las células dejan de ser visibles por el depósito de material y se aprecian numerosas vesículas y micro vesículas, (Fig. 62).

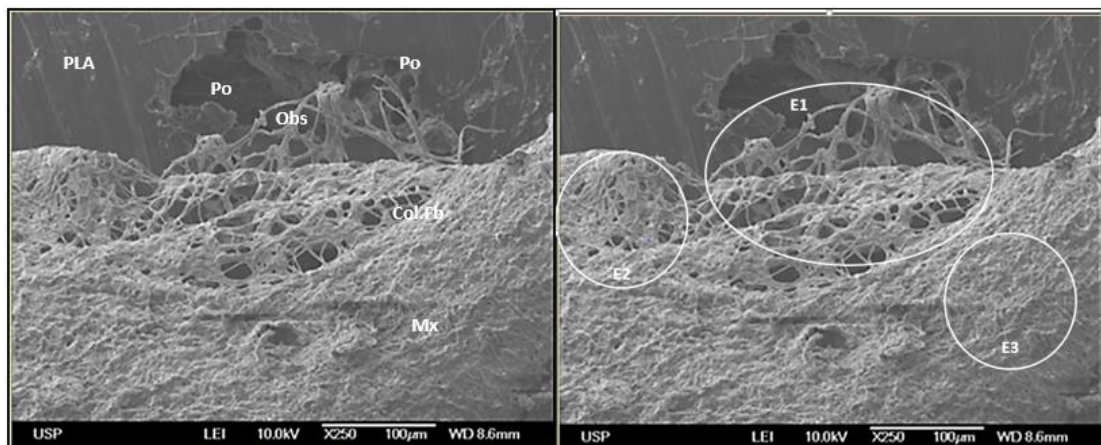


Figura 62. Sector 3. Andamio de PLLA con CHT. Se aprecia un grupo de osteoblastos en el proceso de depósito y maduración de la matriz extracelular. PLA: Andamio de PLA; Po: Poro, Obs: Osteoblastos, Col.Fb: Fibras colágeno; Mx: Matriz extracelular; E1: etapa 1; E2: etapa 2; E3: etapa 3. Técnica SEM.

A mayor aumento se aprecia que el material depositado, está compuesto por numerosas fibras colágeno, embebidas en un material compuesto por estructuras compatibles con vesículas de matriz (V), algunas en proceso de degradación de membrana, que a su vez están constituidas por partículas de menor tamaño (Mv) que están siendo incorporadas en el proceso de formación de la matriz extracelular, (Figs. 63 y 64).

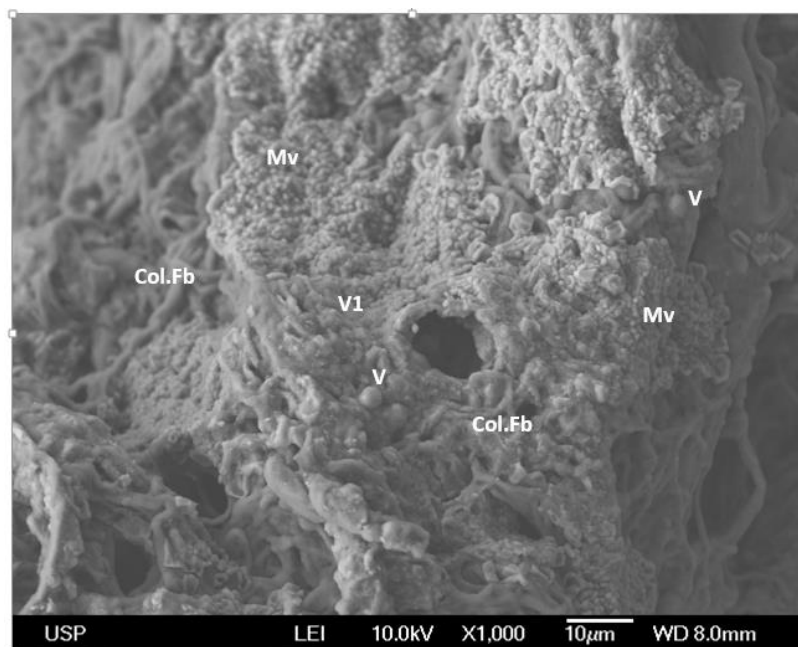


Figura 63. Matriz extracelular depositada sobre un andamio rígido de PLA/CHT. V: Vesículas; V1: Vesícula degradando su membrana; Mv: Micro vesículas; Col. Fb: fibras colágeno. Técnica SEM.

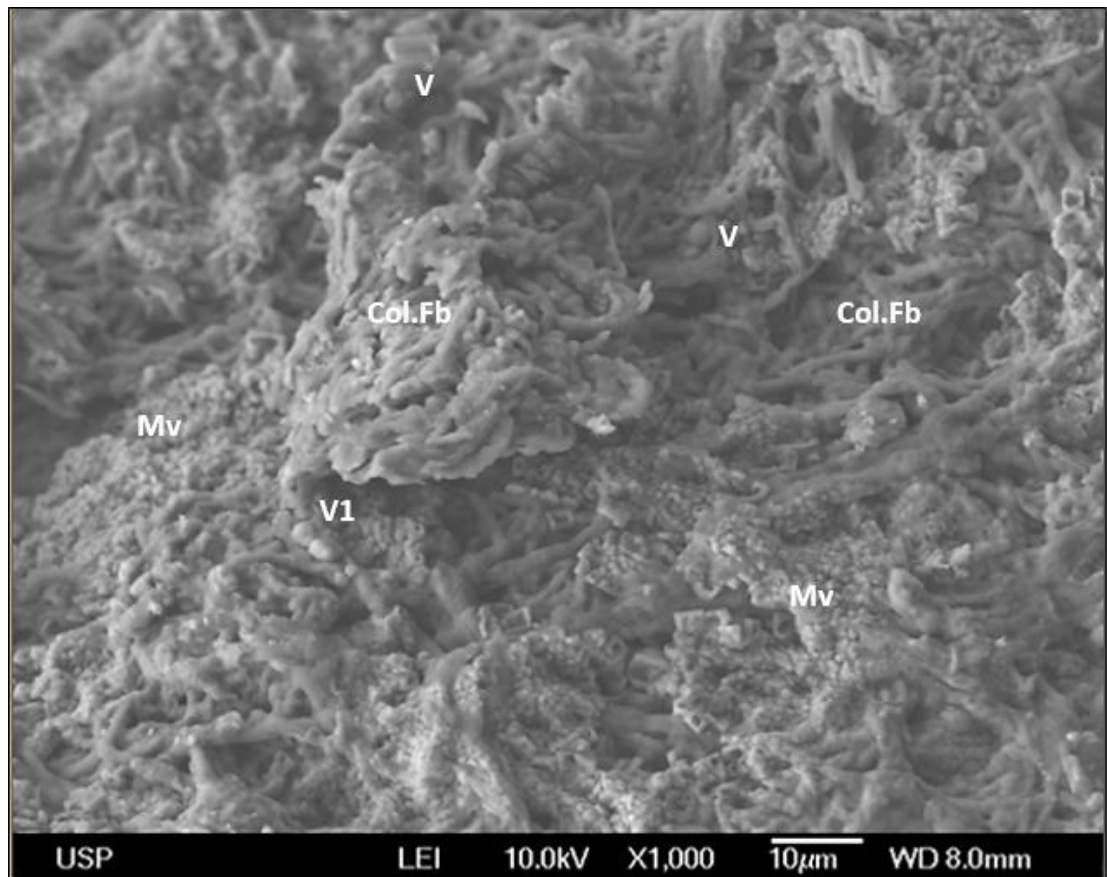


Figura 64. Matriz extracelular depositada sobre un andamio rígido de PLA/CHT. V: Vesículas; V1: Vesícula degradando su membrana; Mv: Micro vesículas; Col. Fb: fibras colágeno. Técnica SEM.

Las imágenes observadas de los dos tipos de andamios (con y sin CHT) muestran diferencias grandes en cuanto a la presencia de células y el depósito de matriz extracelular.

Los andamios sin quitosano muestran la mayor parte de los poros sin llenar y es posible identificar algunos osteoblastos aislados produciendo matriz extracelular, en contraste en los andamios con quitosano, los poros ya se están llenando y las células generalmente no son identificables por estar incluidas en su matriz extracelular; también es notoria la presencia de una matriz extracelular más organizada ensamblada a partir de una red de fibras colágeno cubierta por material de origen celular y con presencia de numerosas vesículas y micro vesículas de matriz.

Si se parte que los dos tipos de andamios fueron cultivados con igual cantidad de células y bajo las mismas condiciones, se aprecia una diferencia en la cantidad y calidad de formación de la matriz que parece haber sido influenciada por la presencia del quitosano.

El quitosano no solo ha estimulado los procesos celulares sino que también sirve de matriz temporal para los osteoblastos como se pudo apreciar en la figura 57 donde el quitosano precipitó sobre la superficie y sobre los poros del andamio como una retícula que está sirviendo de soporte a un grupo de osteoblastos.

3.3.1.2 Caracterización de los andamios flexibles cultivados (SEM):

Al comparar las imágenes de los andamios flexibles con y sin quitosano, también se observan diferencias en cuanto a espacios interfibrilares, persistencia de fibras, presencia de células y formación de matriz ósea extracelular.

Los andamios flexibles de PLLA sin CHT se caracterizaron por conservar una estructura similar a la original, (previa al cultivo), (Fig. 11), a diferencia con los obtenidos por técnica coaxial en los cuales la formación y maduración de la matriz extracelular hacen que se pierdan los rasgos característicos de estos andamios.

En la Fig. 65, se observa varios osteoblastos en contacto con la matriz polimérica de PLLA sin CHT produciendo matriz extracelular.

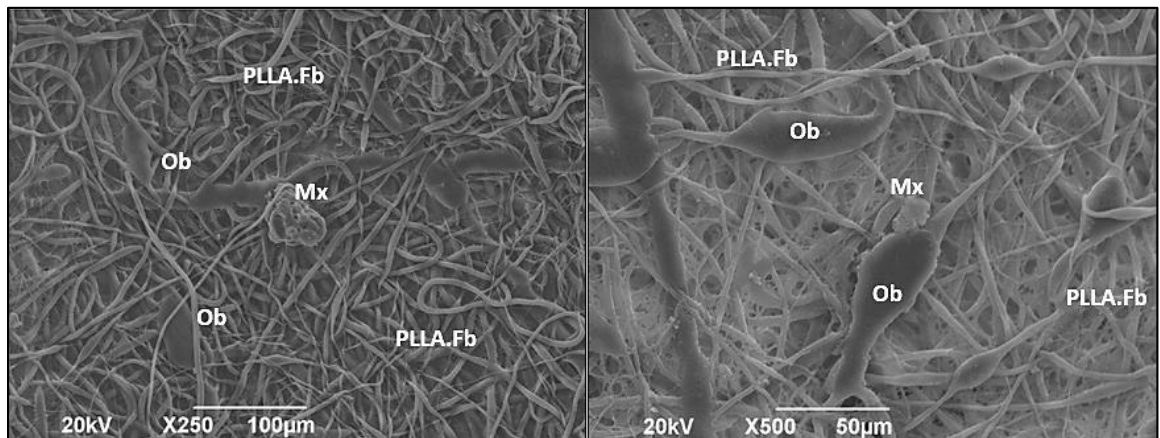


Figura 65. Andamio Flexible de PLLA sin CHT. En la Figura de la izquierda se observa la estructura fibrosa con varios osteoblastos (Ob) y depósitos de matriz extracelular (Mx). A la derecha, a mayor aumento se aprecian dos osteoblastos (Ob) secretando matriz extracelular (Mx).

En las figuras 66 y 67 se presentan los análisis elementarios de la matriz extracelular mostradas en la figura 65, en los dos casos se detecta presencia de elementos constitutivos de la matriz ósea extracelular.

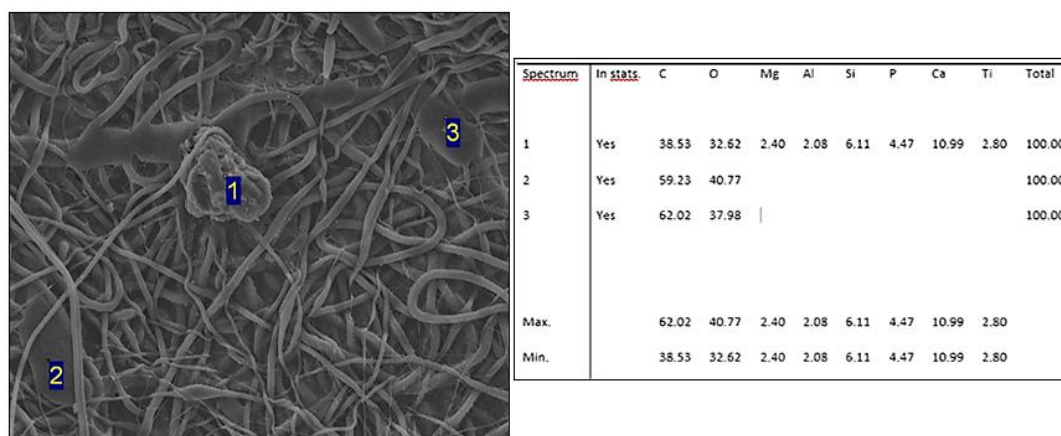


Figura.66. Andamio Flexible de PLLA sin CHT. Técnica SEM/EDS.

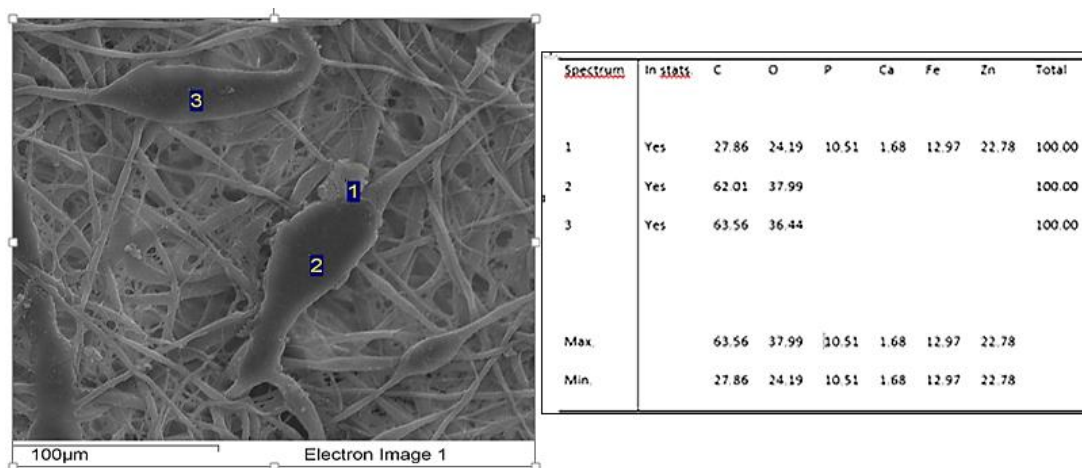


Figura 67. Andamio Flexible de PLA sin CHT. Técnica SEM/EDS.

Cuando se revisan los andamios elaborados con técnica coaxial (PLLA / CHT), se observa que su aspecto es totalmente diferente al que presentan los andamios elaborados con solo PLLA; en los andamios elaborados solo con PLLA las fibras poliméricas sintéticas son identificables, se distingue perfectamente las formas de los osteoblastos, los espacios interfibrilares permanecen generalmente vacíos y la producción de matriz extracelular se observa como acúmulos asociados a osteoblastos; en contraste en los andamios de PLLA con CHT las pocas células que se pueden identificar están incluidas en su matriz extracelular, los espacios entre las fibras tienden a desaparecer y las mismas fibras dejan de ser notorias, (Fig. 68).

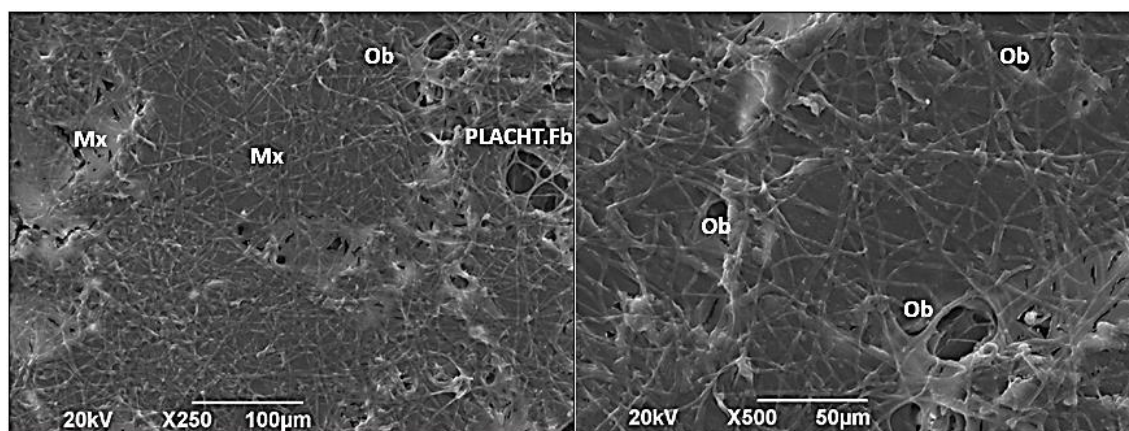


Figura 68. Andamio flexible PLLA- CHT, técnica coaxial. En la figura de la izquierda se aprecia el depósito de una capa de matriz extracelular sobre el andamio polimérico, con disminución de los espacios interfibrilares, se alcanza a observar parte de la estructura polimérica original (PLA/CHT.Fb); a la derecha a mayor aumento se observan varios osteoblastos (Ob) incluidos en su matriz extracelular (Mx). Técnica SEM

En la figura 69 se observan 2 osteoblastos incluidos en su matriz extracelular, el análisis elemental muestra la presencia de calcio y azufre.

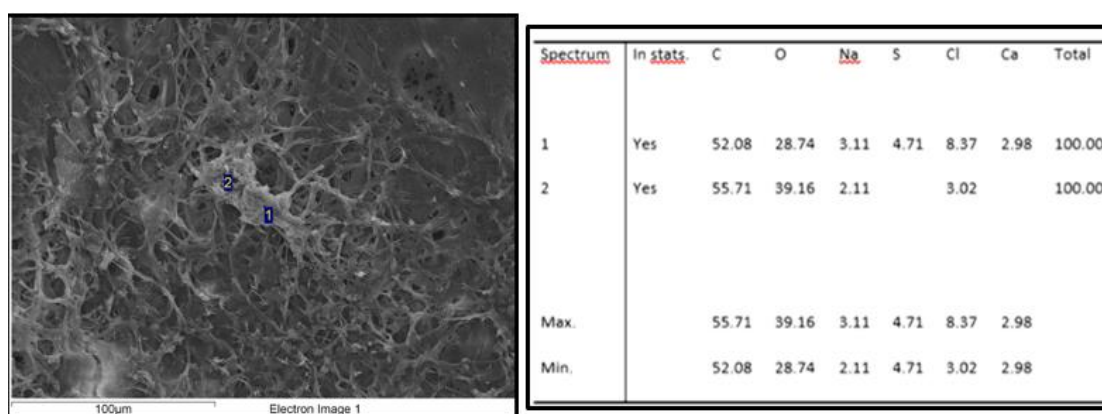


Figura 69. Andamio flexible de PLA/CHT técnica coaxial. SEM/EDS.

Al comparar los dos tipos de andamios (con y sin quitosano) se observa que en los elaborados con solo PLLA el proceso de maduración de la matriz parece estar más atrasado con relación a los elaborados con PLLA/CHT (osteoblastos identificables y presencia de acúmulos de matriz extracelular); mientras que los elaborados en PLLA/CHT presentan la estructura polimérica cubierta totalmente por matriz extracelular, no hay espacios interfibrilares y los pocos osteoblastos identificables están incluidos en su matriz.

Al igual que en la situación planteada para los andamios rígidos, el quitosano parece haber influenciado los procesos celulares y la formación de la matriz extracelular.

Para verificar la influencia o no del quitosano sobre la actividad osteogénica *in vitro* en los 4 tipos de andamios, (Rígidos con y sin quitosano y Flexibles con y sin quitosano); se determinaron como variables de respuesta: la presencia de poros llenos (mayor a un 60%), presencia de osteoblastos identificables, células incluidas en su matriz, persistencia de la estructura polimérica, presencia de fibras colágeno, presencia de depósitos de producido celular y presencia de componentes de la matriz extracelular; se asignó un valor de 1 (uno) a la presencia de la variable y de 0 (cero) a la ausencia de la misma.

Por la naturaleza de las variables no fue pertinente realizar una diseño experimental fundamentado por el Análisis de Varianza (ANOVA), ya que las variables son de característica presencia/ausencia; por esta razón se planteó un modelo de regresión logístico entre la presencia de quitosano y las demás variables para ambos tipos de andamio (la presencia de quitosano actúo como variable independiente y las demás como variables respuesta) y se evaluó la relación entre las variables. Como método de estimación se utilizó la razón de disparidad (OR), la cual está asociada a los parámetros del modelo

En el desarrollo del modelo se ajustaron 32 modelos de regresión logística, donde la presencia de quitosano es la variable predictora, de la siguiente manera:

Tabla 1. Diseño de experimento para regresión logística, Andamios bioactivados. Fase *in vitro*.

Fase del experimento	In vitro
X	Y _i
Presencia CHT	$i = 1 \rightarrow$ Presencia poros llenos > 60%
	$i = 2 \rightarrow$ estructuras celulares identificables
	$i = 3 \rightarrow$ estructuras celulares incluidas en su matriz
	$i = 4 \rightarrow$ Persistencia estructura polimérica
	$i = 5 \rightarrow$ presencia fibras colágeno
	$i = 6 \rightarrow$ Presencia depósitos producido celular
	$i = 7 \rightarrow$ Presencia elementos matriz extracelular

Mediante el criterio de la devianza se determinó si existía relación entre las Y_i (variables respuesta) y la presencia de quitosano, en otras palabras, se realizó un contraste de hipótesis donde:

H_0 : La presencia de quitosano está relacionada con la presencia de cada una de las variables en los diferentes tipos de andamios.

H_1 : La presencia de quitosano no está relacionada con la presencia de cada una de las variables en los diferentes tipos de andamios.

Devianza de los modelos ajustados

El criterio de la devianza, fue utilizado para evaluar el ajuste de los datos al modelo propuesto; a continuación se presenta el valor calculado de la devianza contra el valor teórico de la tabla chi- cuadrado y la regla de decisión según las hipótesis establecidas.

Tabla 2. Análisis de la influencia del quitosano en la regeneración ósea en andamios de ácido poliláctico bioactivados, Fase *in vitro*.

Variable	Devianza			
	In vitro Rígido		In vitro Flexible	
Presencia poros llenos > 60%	2,52E-04	✓	5,74E+06	✗
estructuras celulares identificables	9,56E+06	✗	1,38E+07	✗
estructuras celulares incluidas en su matriz	9,56E+06	✗	5,41E+06	✗
Persistencia estructura polimerica	6,28E+06	✗	8,38E+06	✗
presencia fibras colageno	1,20E+07	✗	5,57E-04	✓
Presencia depositos producido celular	2,52E-04	✓	5,57E-04	✓
Presencia elementos matriz extracelular	2,10E+07	✗	8,32E+06	✗
Grados de libertad	8		5	
$\chi^2_{(5\%)}$	2,732637		1,145476	

Los resultados del modelo desarrollado mostraron que la presencia de quitosano influyó significativamente en la presencia de poros llenos y en la presencia de producido celular, para el caso de los andamios rígidos; y en la presencia de fibras colágeno y en el producido celular para el caso de los andamios flexibles.

Los resultados presentados están de acuerdo con lo observado mediante microscopia electrónica de barrido donde se encontró un mayor depósito de matriz extracelular en los andamios rígidos y flexibles con quitosano, lo cual se puede explicar por el efecto que tiene el CHT sobre los procesos celulares a través de su interacción con componentes de la matriz extracelular.

El quitosano por su naturaleza catiónica se relaciona fácilmente con glucosaminoglicanos y proteoglicanos anionicos, y a través de ellos puede participar en la modulación de funciones celulares como la morfología y la diferenciación celular; el complejo quitosano- proteoglicanos es capaz de concentrar citoquinas y

factores de crecimiento secretadas por las células colonizadoras, (28), (44) y de esta forma intervendrá en las funciones celulares.(65).

3.3.1.3 Caracterización de los andamios flexibles cultivados (TEM):

La formación de la matriz ósea extracelular es una función osteoblástica en la que participa toda la maquinaria celular, mediante la activación de genes y vías de diferenciación específica (61), (66), (67), las diferentes imágenes obtenidas mediante SEM, mostraron un tejido en proceso de maduración con presencia de células compatibles con osteoblastos y fibras similares al colágeno tipo I asociado a depósitos de calcio, lo que indica la conservación del fenotipo osteoblástico; esto está de acuerdo con lo reportado por Baker, A & Klein-Nulend, J (48) , quien en sus diferentes trabajos sobre aislamiento de osteoblastos observa que el fenotipo no se altera.

En los estudios sobre osificación, ha tomado fuerza la idea que es el mismo osteoblasto quien secreta los precursores de fosfato de calcio para que actúen como nucleadores iniciales para el depósito de calcio (68), (69), (70), aunque en este trabajo no se caracterizó el contenido específico de las vesículas, se identificaron osteoblastos en proceso de secreción de ellas (Fig. 70), también se encontraron estructuras circulares, compatibles con MVs, algunas al parecer en estado de degradación de su contenido y su incorporación a la matriz extracelular como micro vesículas (Figs. 48, 57, 60, 63 y 64).

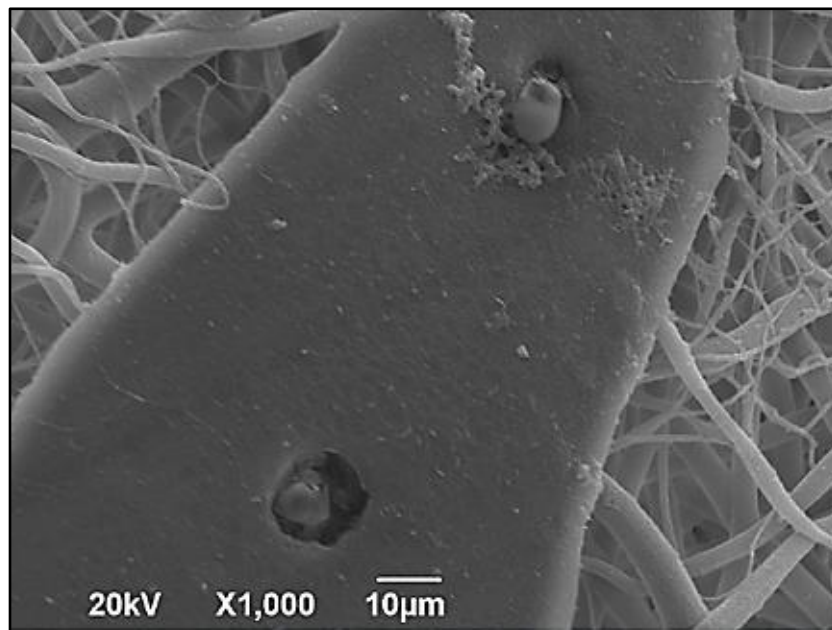


Fig. 70. Se aprecia un osteoblasto secretando vesículas de matriz a través de poros, célula cultivada en un andamio flexible de PLLA sin quitosano. Técnica SEM.

Utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM), se realizaron análisis a diferentes andamios cultivados, confirmandose la presencia de vesículas en el interior de las células pero también en el exterior de las mismas, además presencia abundante de cristales en relación con estructuras fibrilares.

La figura 71 muestra las imágenes de un osteoblasto identificado en un andamio rígido de PLA con CHT, con presencia de estructuras redondeadas electrodensas en el interior y en el espacio extracelular, compatibles con vesículas de matriz con contenido mineralizado.

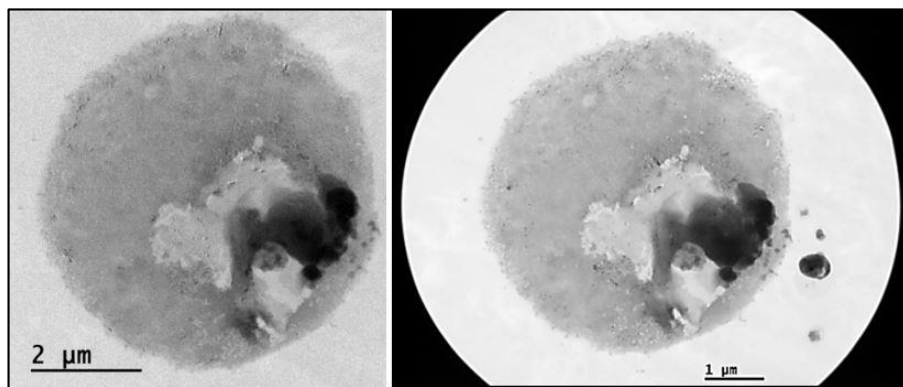


Figura 71. Osteoblasto a diferente magnificación con presencia de estructuras electrodensas en el interior, en la membrana y en el espacio extracelular. Técnica TEM.

En la figura 72 se aprecian estructuras redondeadas radiodensas de diferente tamaño, en un andamio rígido de ácido poliláctico con quitosano, compatible con vesículas de matriz con contenido mineralizado.

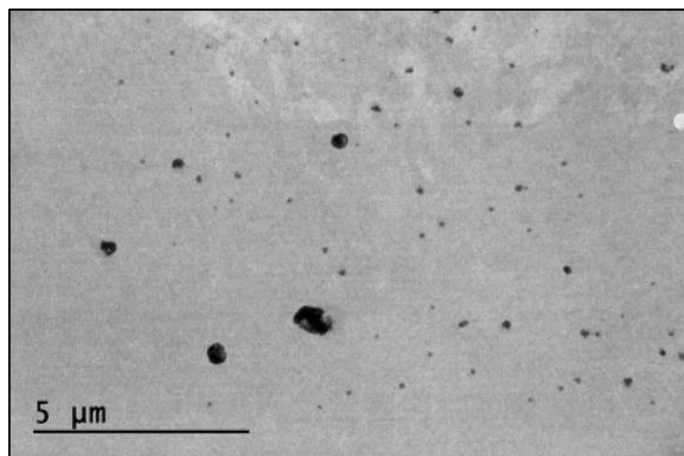


Fig. 72. Andamio rígido de PLLA-CHT. Técnica TEM.

La figura 73 muestra depósito de un material electro denso en relación con estructuras fibrilares, en la figura 74 a mayor magnificación se aprecia también crecimiento de cristales en el andamio rígido de PLLA- CHT.

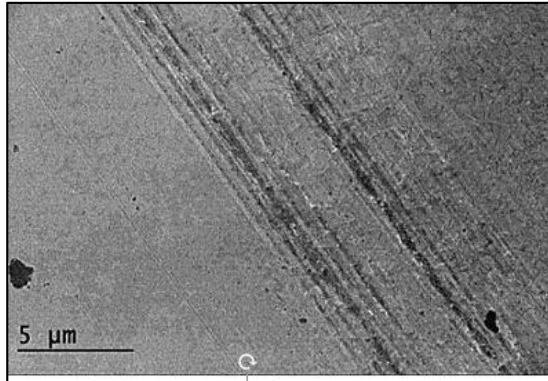


Fig. 73. Andamio rígido PLLA-CHT. TEM.

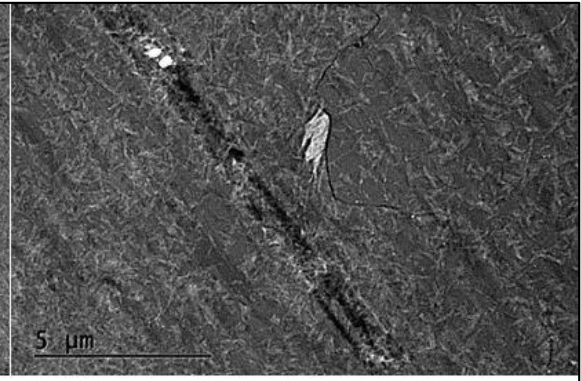


Fig. 74. Andamio rígido PLLA-CHT. TEM.

En las figuras 75 y 76, se aprecian las estructuras fibrilares a mayor magnificación con presencia de estructuras redondeadas electrodensas y no electrodensas compatibles con vesículas de matriz

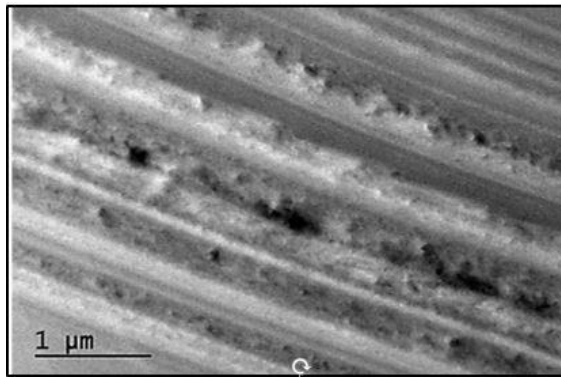


Fig. 75. Estructuras fibrilares con vesículas asociadas. Técnica TEM.

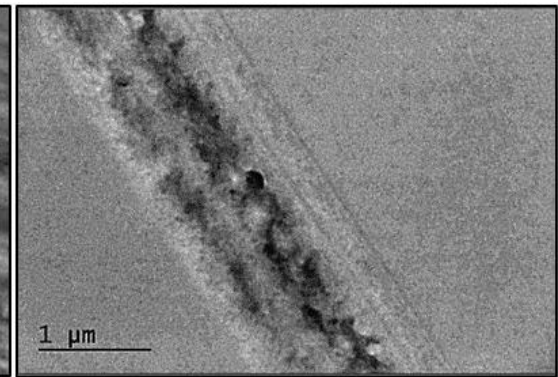


Fig. 76. Sector de la figura 75 a mayor aumento. Técnica TEM.

En las figura 77 y 78 se muestra un acumulo de producido celular de gran tamaño y presencia de cristales en crecimiento asociados a estructuras fibrilares.

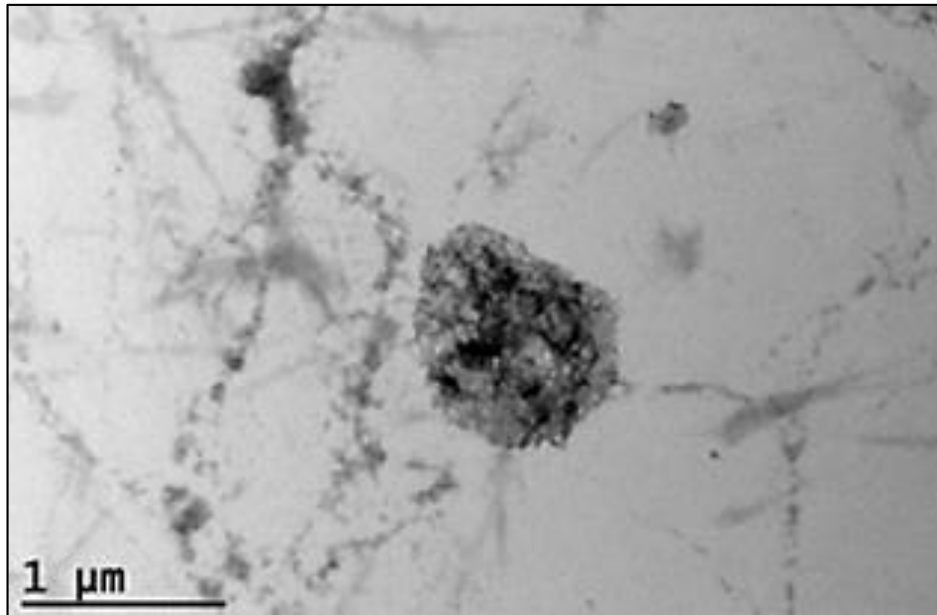


Fig. 77. Andamio flexible de PLLA/ CHT. Técnica TEM.

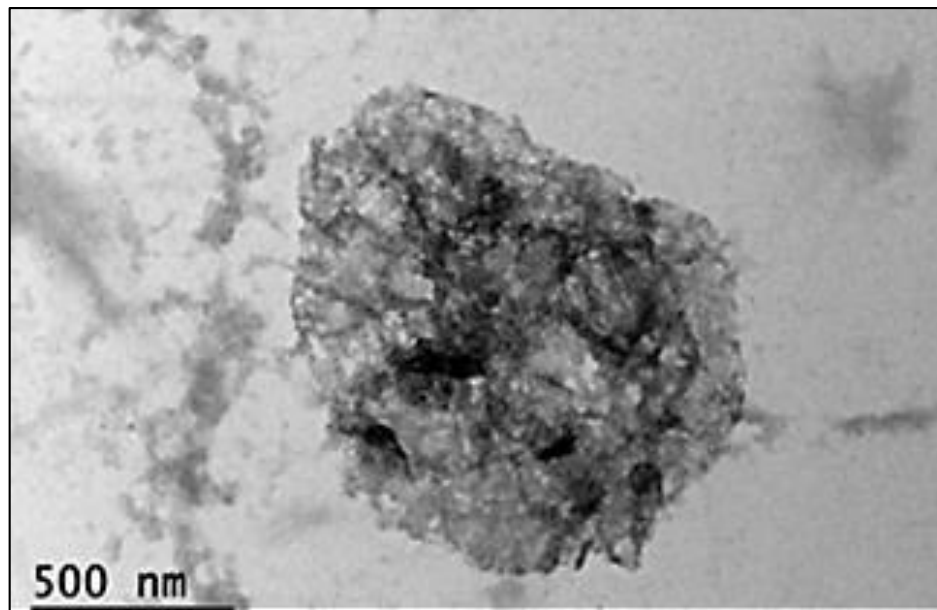


Fig. 78. Andamio flexible de PLLA/ CHT. Técnica TEM.

La figura 79 corresponde a diferentes acúmulos de matriz extracelular en proceso de mineralización, se aprecian numerosas vesículas de matriz electrodensas y no electrodensas.

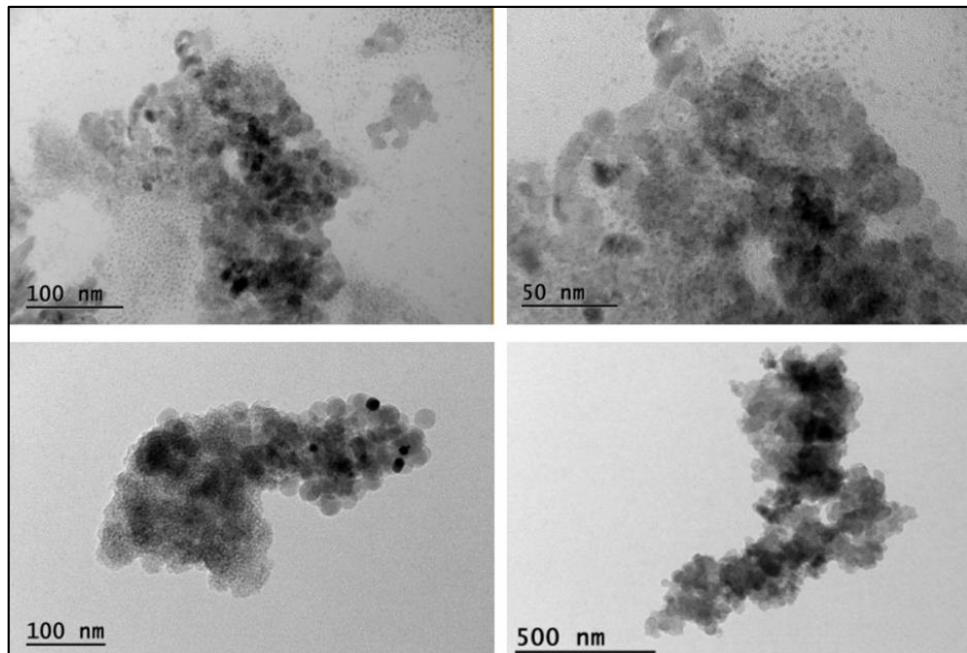


Fig. 79. Andamio flexible de PLLA/ CHT. Se observa acúmulos de matriz extracelular en proceso de mineralización. Técnica TEM.

En la figura 80 se puede apreciar a diferentes aumentos el crecimiento de cristales en un andamio flexible de PLLA con quitosano, cultivado con osteoblastos.

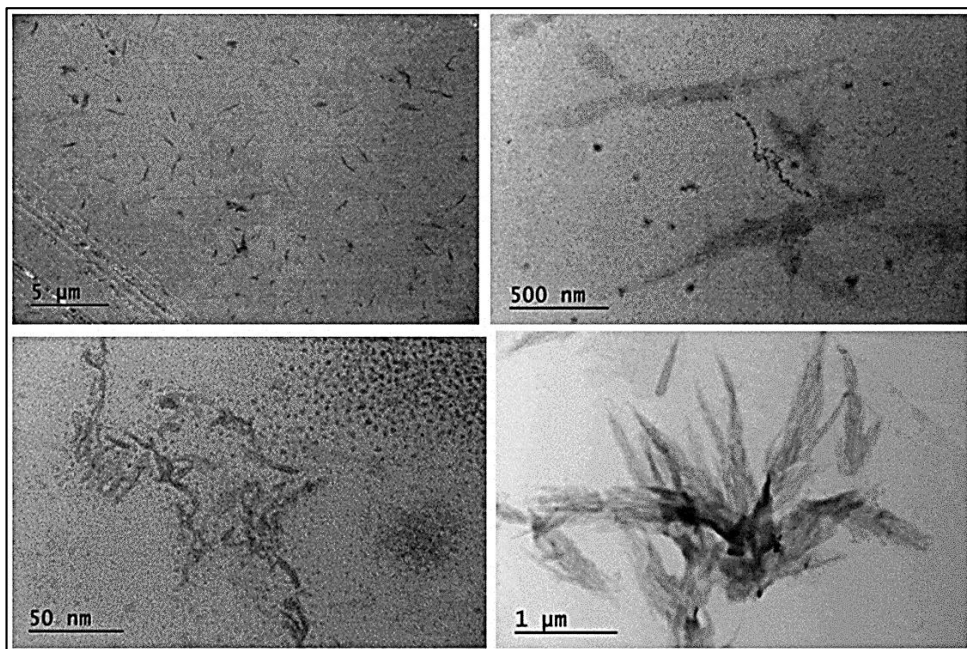


Fig. 80. Crecimiento de cristales en un andamio flexible de PLLA. Técnica TEM.

Las imágenes obtenidas a partir de microscopia electrónica de transmisión permitieron identificar osteoblastos liberando estructuras redondeadas de aspecto electro denso compatibles con vesículas de matriz muy similares a los reportados en la literatura especializada, también fue posible identificar producido celular (matriz extracelular) conformada por fibras, material asociado a ellas, cristales de diferentes formas y estructuras redondeadas compatibles con vesículas de matriz electrodensas y no electrodensas, estructuras que ya se habían evidenciado en los andamios estudiados mediante el SEM.

Los hallazgos mostrados acerca de la formación y maduración de la matriz ósea extracelular, en osteoblastos cultivados en andamios, están de acuerdo con los mecanismos generales propuestos por Anderson, H; et al (2005) (68); Boonrungsiman, S; et al (2012) (69), Golub E. (2009) (70), Mahamid, J; et al (2011) (71), y Stenbeck, G; et al (2014) (72); según los cual las vesículas una vez producidas madurarían en lisosomas y serían transportadas y/o liberadas al espacio extracelular en forma de MVs, la membrana de la vesícula se degrada, y su contenido liberado como micro vesículas, e incorporado a la retícula de colágeno para ayudar a conformar la matriz extracelular.

3.4. Desarrollo del modelo animal e implantación de las matrices extracelulares artificiales

Los animales fueron pesados y sedados con una combinación de Clorhidrato Ketamina (80 mg/kg peso) y Xilacina al 2% (15 mg / Kg peso), en aplicación intramuscular.

Una vez obtenida la sedación se procedió a la implantación, (Figuras 58 y 59), según el siguiente protocolo:

- 1) Tricotomía parte superior del cráneo
- 2) Desinfección con Isodine solución ®
- 3) Anestesia infiltrativa con lidocaína con epinefrina 1:100
- 4) Incisión sobre la línea media, con relajantes laterales
- 5) Separación de tejidos blandos con elevación de colgajo de espesor total
- 6) Preparación de cavidades circunferenciales de 5 mm de diámetro y 0,8 mm de profundidad
- 7) Colocación del andamio según corresponda, en los defectos control se deja vacío.
- 8) Reposicionamiento de tejidos blandos y sutura con material reabsorbible 4 ceros.
- 9) Aplicación tópica de Gentamicina®.
- 10) Aplicación de Clindamicina 600 mg IM y Diclofenac 75 mg IM.

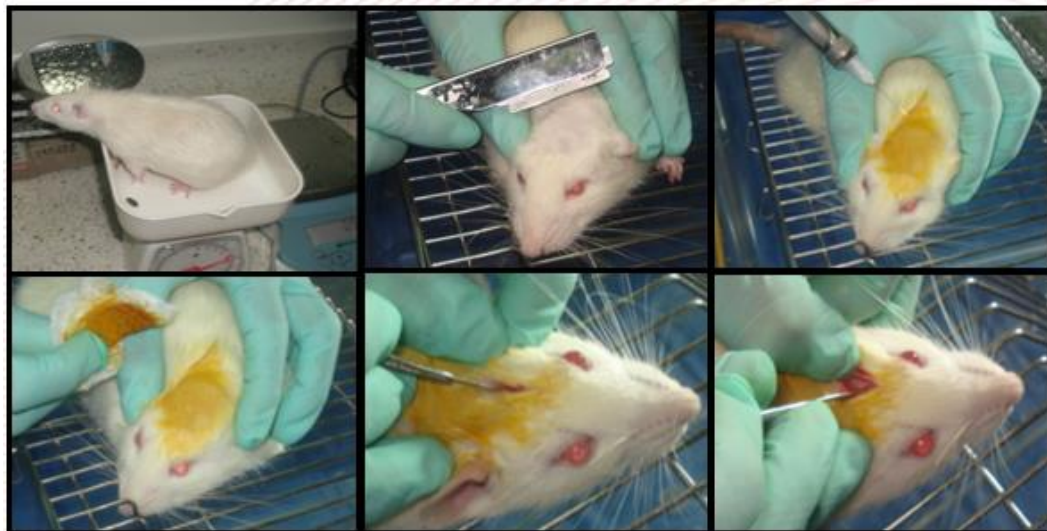


Fig. 81. Preparación de tejidos blandos para injertar el andamio

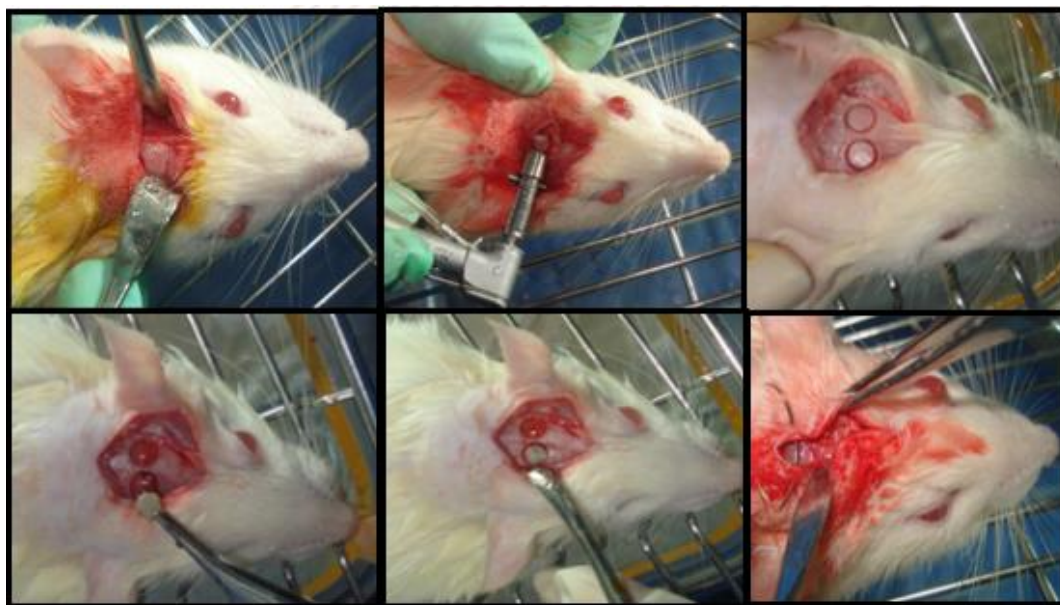


Fig. 82. Preparación de los defectos óseos y colocación del andamio

3.5. Recuperación y preparación de las muestras

Después de tres meses de implantación se realizó eutanasia con isofluorano y eutanax® intraperitoneal; las muestras fueron recuperadas y fijadas en glutaraldehído al 5%.

Algunas muestras se emplearon para realizar estudios con microscopia electrónica de barrido y otras para estudios con microscopia óptica, para lo cual se decalcificaron durante 2 meses mediante inmersión en solución PBS- EDTA con cambio de solución cada 48 horas. Posteriormente se procesaron mediante técnica estándar de deshidratación, infiltración e inclusión (Anexo 6) y se obtuvieron cortes de 5 micrómetros que fueron utilizados para realizar análisis de interfaces y estudios histomorfométricos.

3.5.1. Validación del diseño experimental de tamaño crítico

En ciencias biomédicas cualquier modelo animal de experimentación debe ser estandarizado, reproducible y ajustado al propósito de simular la respuesta en humanos,(73).

Cuando se quiere evaluar la influencia de un biomaterial sobre la regeneración ósea es indispensable utilizar un defecto de tamaño crítico (74) , el modelo de defecto de tamaño crítico utilizado en esta investigación cumple con estos criterios y ha sido ampliamente utilizado a lo largo de los años para estudiar el comportamiento de biomateriales, siendo uno de los más empleados, (75).

En la definición clásica de Schmitz y Hollinge (1986), (76), el defecto de tamaño crítico es el más pequeño tamaño intraóseo, que no cicatrizará durante toda la vida del animal y su dimensión deberá ser definido para cada especie y hueso en particular; actualmente se acepta como defecto de tamaño crítico a aquel que no cicatrizará durante el tiempo del estudio, de acuerdo a la propuesta de Gossain del año 2002 (citado por Vajgel, et al, en el 2013), (75).

Si partimos del hecho que toda lesión tendrá algún tipo de cicatrización, en este estudio se aceptó la definición de Gossain, pero se tomara como respuesta cicatrizal apropiada la cicatrización del defecto por “regeneración ósea”.

Por tratarse de un diseño experimental de defecto crítico, por control de defecto vacío, un grupo de preparaciones fueron dejadas sin ningún tipo de injerto (andamio); en el sentido expuesto anteriormente se considerara válido el diseño sólo si no hay evidencia de regeneración de la lesión intraósea creada (5 mm de diámetro por 0,8 mm de profundidad) en el defecto control, siendo aceptable un porcentaje de neoformación menor a un 30% ya que este valor ha sido determinado en otras investigaciones y considerado como porcentaje de neo formación aceptable para un defecto control (vacío) de 5 milímetros de diámetro en hueso parietal de rata wistar, según Vajgel A, et al. 2013 (75); Fernández T, et al. 2014 (44),(77).

Se dispuso de 13 preparaciones tipo control, al recuperar las muestras se observó macroscópicamente la presencia de un tejido blando, delgado, muy lábil, recubriendo el defecto por su superficie periostica; el cual tendía a separarse cuando se levantaron los colgajos para exponer el tejido óseo.

De los 13 casos tipo control, 9 fueron estudiadas con microscopia electrónica de barrido y 4 mediante técnicas de histoquímica (Hematoxilina & Eosina y Tricromías de Masson y Gomori).

La figura 83 corresponde a una imagen de la superficie periostica del tejido que cubre el defecto control, se observa una textura fibrosa y depósito de cristales, que corresponden a tejido cicatrizal.

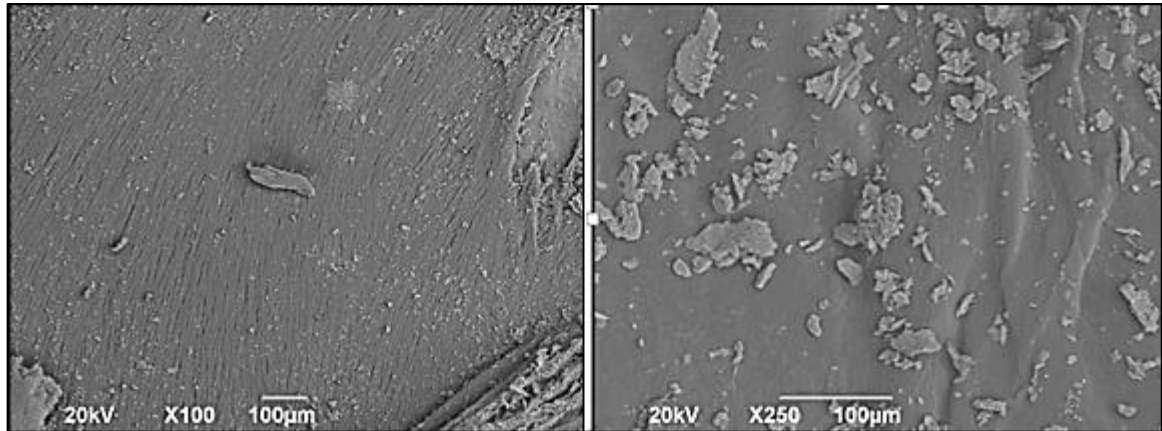


Fig. 83. Tejido cicatrizal recubriendo preparación sin injertar en hueso parietal de Rata Wistar. Vista desde superficie periostica. Técnica SEM.

En la figura 84 se presenta la zona de la preparación vista desde la superficie meníngea, se aprecian los márgenes del defecto óseo y la textura fibrosa del tejido cicatrizal que lo cubre, además observan depósitos de cristales en su superficie; en la imagen es posible apreciar el contorno circular de la preparación intraósea, sin ninguna evidencia de regeneración.

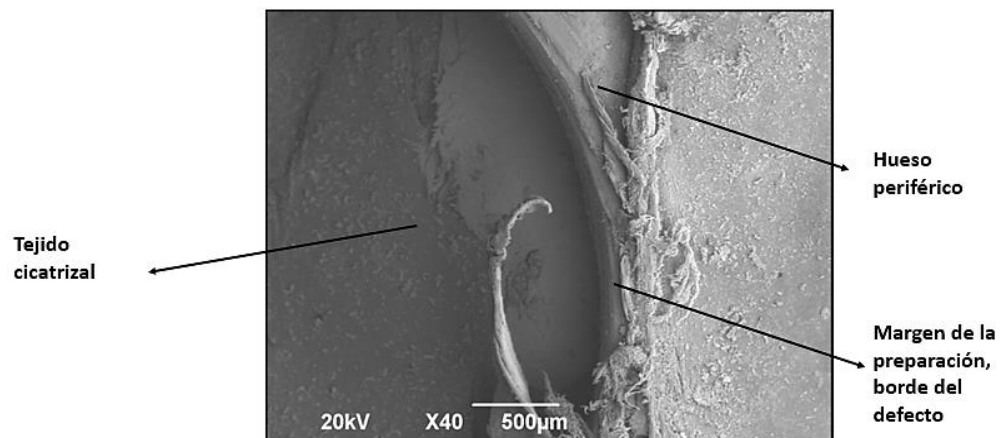


Fig. 84. Tejido cicatrizal recubriendo preparación sin injertar en hueso parietal de Rata Wistar. Vista desde superficie meníngea. Técnica SEM.

La figura 85 corresponde también a un defecto control y permite confirmar la naturaleza fibrosa de este tejido, que paulatinamente es sellado por un material más homogéneo, el cual se puede observar hacia la periferia; también se aprecia presencia de cristales sobre la superficie del tejido cicatrizal.

La superficie meníngea del tejido cicatrizal presenta 3 zonas claramente distinguibles, la primera está en la periferia del defecto (Z1), cerca de los márgenes óseos y su apariencia es muy similar a la de la superficie periostica, hay una segunda zona de tipo intermedio (Z2) y una tercera en el centro del defecto con una textura muy fibrosa (Z3), (Figura 85).

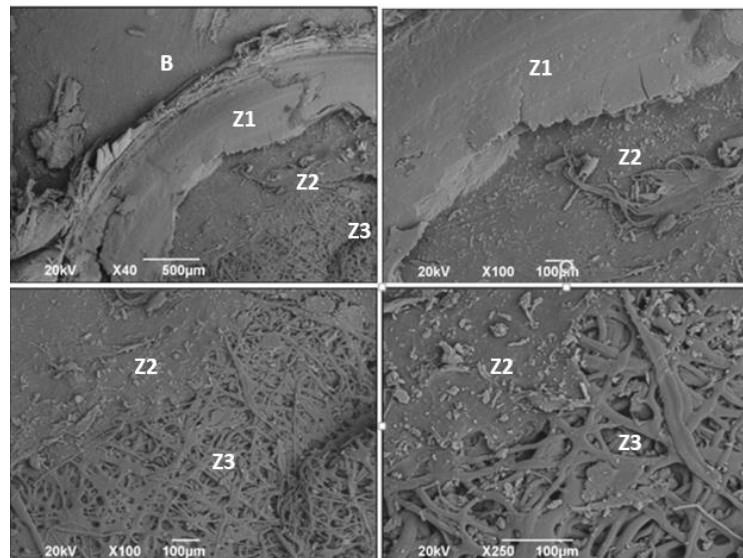


Fig. 85. Tejido cicatrizal recubriendo preparación sin injertar en hueso parietal de Rata Wistar. Vista desde superficie meníngea. B: Hueso periférico; Z1: Zona 1; Z2: Zona 2; Z3:

Al analizar los cristales presentes en la superficie periostica del defecto, se identifica presencia de calcio y fósforo que estarían indicando mineralización del tejido fibroso (Figura 86).

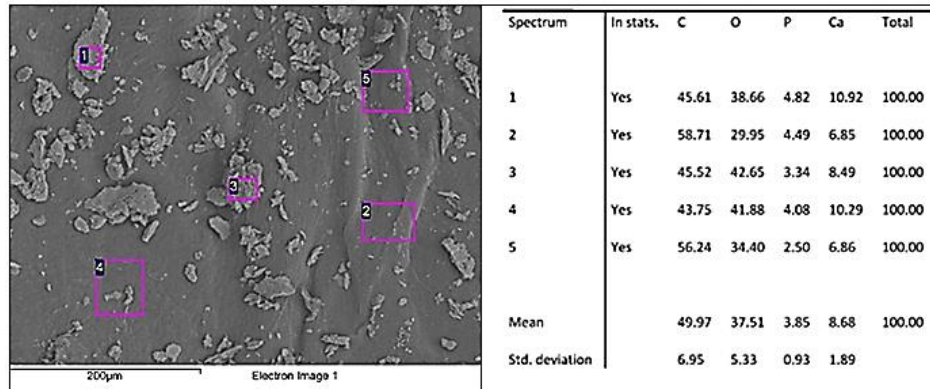


Figura 86. Análisis elemental de la superficie periostica del defecto control. Técnica SEM/EDS.

La figura 87 muestra el análisis realizado a la superficie meníngea y se puede apreciar que los porcentajes de fósforo y calcio de la primera zona descrita (cerca de la periferia ósea) son mucho mayores que en las otras dos zonas.

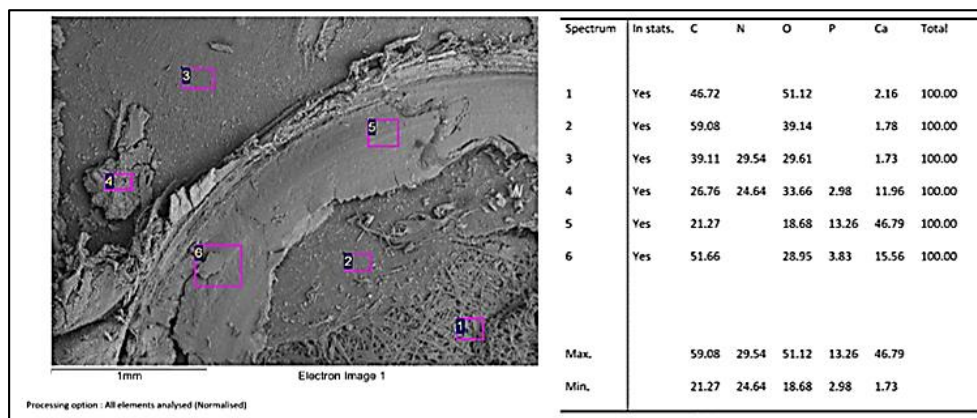


Figura 87. Análisis elemental de la superficie meníngea del defecto control. Técnica SEM/EDS.

En las 9 preparaciones con defecto control estudiadas con esta técnica, (100%), se observó una situación similar a la ya descrita, evidenciándose la no regeneración del defecto y la presencia de un tejido cicatrizal de tipo fibroso sobre la superficie periostica, además se encontraron cristales de fosfato de calcio, de tamaño pequeño en sus superficies periostica y meníngea.

En términos generales se observa que el tejido cicatrizal visto desde la superficie periostica es más homogéneo y la textura fibrosa no es tan definida (Figura 83), si se compara con la textura que presenta la imagen desde la superficie meníngea (Figura 85), además parece haber un intento de selle de la superficie del defecto pero no por regeneración ósea ya que las superficies internas del defecto no muestran cambios, sino a expensas del tejido fibroso que lo cubre y que si presenta evidencias de mineralización.

Con el fin de tener una visión más integral del proceso de cicatrización del defecto control se realizaron tinciones con Hematoxilina Eosina (H&E), Tricromía de Masson y Tricromía de Gomori.

La figura 88 muestra un defecto control a una magnificación de 4x observándose las interfaces hueso / defecto y la zona del defecto mismo rodeado por un tejido fibroso, sin mayores evidencias de osificación, con excepción de una pequeña zona en la superficie meníngea en continuidad con el hueso periférico y que correspondería a la zona 1 (Z1) identificada en la figura 85.

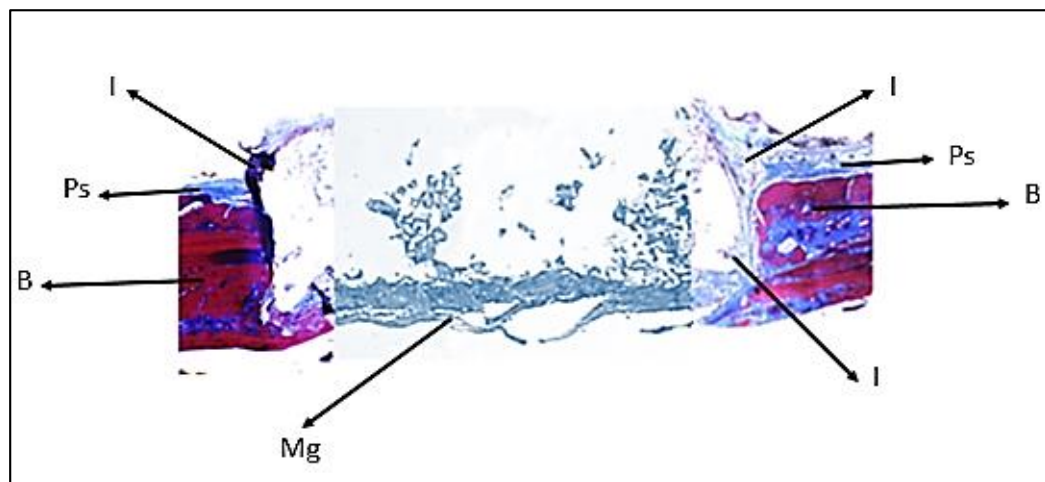


Figura 88. Defecto control. Se aprecia el hueso periférico (B), y el defecto vacío limitado por tejido fibroso en su superficie periostica (Ps), meníngea (Mg) y en sus interfaces defecto-Hueso (I). Técnica TM, 4X.

Las figura 89, muestra otro defecto control preparado con tinción de Tricromía de Masson; se aprecia la preparación ocupada por un tejido cicatrizal delimitado por fibras de color café y en el interior se identifican fibras colágeno tipo I de color azul.

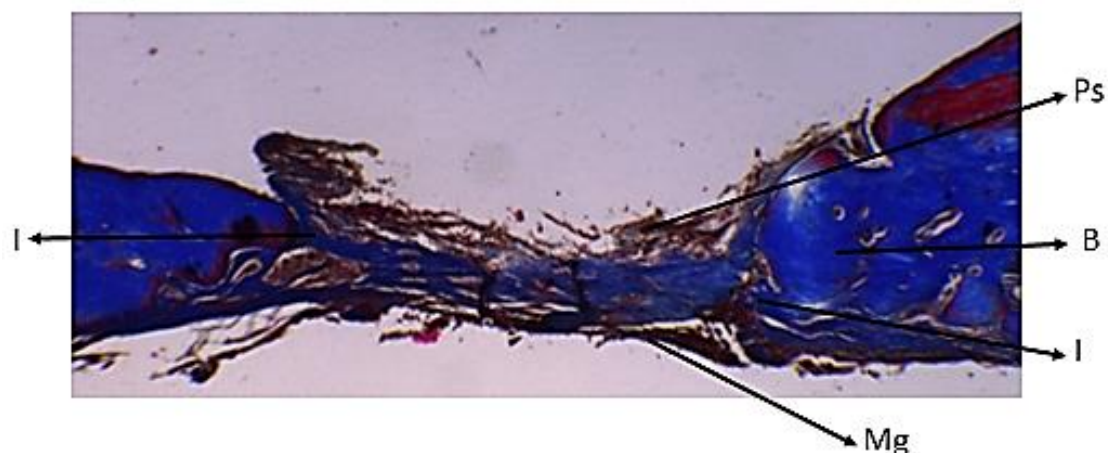


Figura. 89. Defecto control en hueso parietal de Rata Wistar. Ps; Superficie periostica; Mg: superficie meníngea; I: Interfaz Hueso/andamio. Técnica TM. 4X. 2015

En la figura 90 se observa en el defecto control con tinción de Gomori para colágeno tipo III, se evidencia presencia de estas fibras rodeando el defecto por las superficies periostica, meníngea y en el interior del tejido cicatrizal; se aprecian sitios de neo formación ósea en la superficie meníngea.

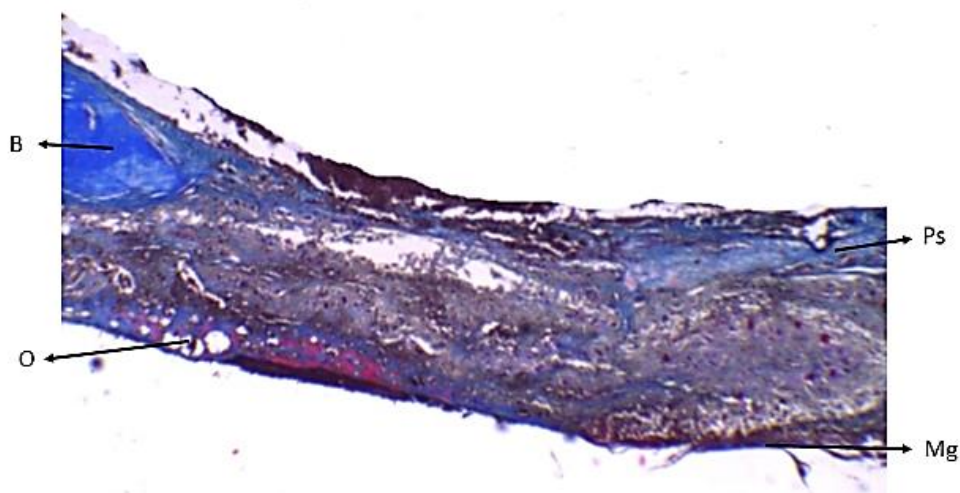


Figura 90. Defecto control mostrando presencia de fibras colágeno tipo III (Color azul). B: Hueso periférico; Ps: Superficie periostica; Mg; Superficie meníngea; O: Sitio de neo formación ósea. Técnica TG, 4X.

En la figura 91 se aprecia un defecto control procesado con técnica de Masson para visualizar colágeno tipo I, en la imagen del centro se aprecia el tejido

fibroso que está cubriendo la preparación y en los dos extremos las interfaces Hueso-Defecto.

El defecto está cubierto por un material de consistencia fibroso que parece continuarse con el periostio que cubre al hueso periférico; tanto las fibras del periostio como las que se formaron en el defecto mostraron ser colágeno tipo I.

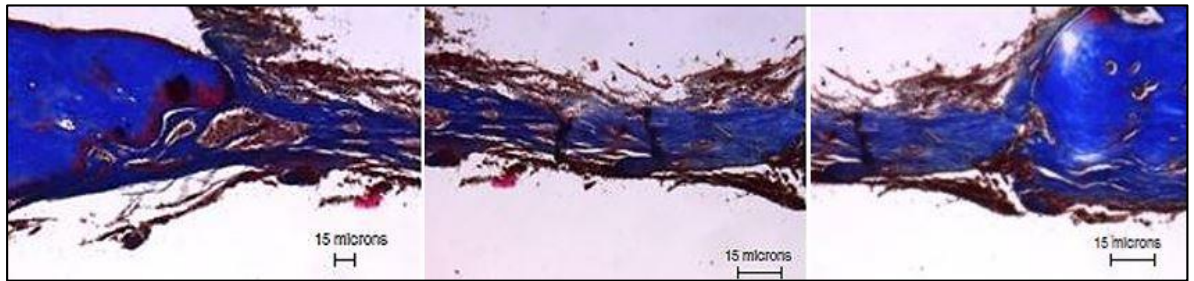


Figura 91. Hueso parietal de Rata Wistar. Zona de un defecto control. En la imagen del centro se observa la zona propia del defecto, en los dos extremos las interfaces hueso defecto. Técnica Tricromía de Masson, magnificación 10X.

La figura 92 muestra un corte de la misma muestra control, procesado con técnica de Gomori para colágeno tipo III; al igual que en la figura anterior se observa la presencia de fibras rodeando el defecto y que parecer están en continuidad con el periostio.



Figura 92. Hueso parietal de Rata Wistar. Zona de un defecto control. En la imagen del centro se observa la zona propia del defecto, en los dos extremos las interfaces hueso / defecto. Técnica Tricromía de Gomori, magnificación 10X.

Los resultados del análisis de los defectos control, (vacíos), muestran un 100% de ausencia de regeneración del defecto y se evidencia una cicatrización de tipo fibroso que rodea todo el defecto y parece originarse del periostio; las fibras encontradas se ubican paralelas a la superficie de corte, parecen estar en comunicación directa con el periostio y fueron caracterizadas mediante técnicas histoquímicas para colágeno tipo I y III.

Los hallazgos presentados en este estudio con relación al defecto control son similares a los mostrados por otros autores; Issa, J.; et al. (2009)(78) , encuentran en un diseño experimental de 6mm en calota de rata diferencias

significativas entre los grupos experimentales y el control; Mariano, R; et al. (2010), (74), en un diseño de 5 mm encuentran también presencia de fibras colágeno paralelas al defecto y escasa neo formación ósea con presencia de tejido necrótico en los bordes del defecto; Zanchetta, P.; et al. (2012),(79), encuentran ausencia de regeneración en todos los defectos control y cicatrización de tipo fibroso; Ortolan, x ; et al. (2014) (80) reportan que los defectos control presentan cicatrización fibrosa que se continúa con el periostio y no exhiben signos de reparación.

En estudio realizado por Fernández, T; et. al. (2014), (44) reportan ausencia de cierre completo del defecto óseo, pero encuentran una línea de neo formación de aproximadamente un 20% del área.

En el meta análisis realizado por el grupo de Vajgel, A; et al. (2014, (75), se encontró que en 60 estudios 12 mencionaron algún tipo de neo formación ósea (menor al 45%) y de 447 defectos estudiados sólo 7 (1, 6 %) mostraron cierre completo del defecto (con base a análisis histológico); Oliveira, M.R; et al. (2015), (81), también reportan cierre por tejido fibroso; Allais, M; et al. (2015), (82), tampoco encuentran regeneración espontánea de los defectos control.

3.5.2 Análisis de Interfaces en los defectos experimentales

En la aplicación clínica de cualquier tipo de injerto es importante determinar si el injerto, en este caso la matriz extracelular sintética, se está biointegrando y si el material de injerto se está degradando y/o resorbiendo, además si hay remplazo por tejido óseo, en este trabajo se consideró importante determinar lo que estaba ocurriendo en la interfaz Andamio- Hueso, y a nivel de interacción células- material polimérico.

3.5.2.1. Análisis por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Inicialmente se realizaron análisis mediante microscopia electrónica de barrido; las muestras destinadas a análisis fueron fijadas con alcoholes ascendentes (75%, 90%, 100%), se permitió secar a temperatura ambiente en cabina de seguridad biológica, se prepararon para su análisis con recubrimiento en metales preciosos y se estudiaron con la herramienta EDS a nivel de la interfaz andamio- hueso y sobre la superficie de la estructura a estudiar.

En la figura 93 se pueden observar imágenes de los 4 tipos de andamios utilizados: Tipo B (Rígido de PLLA), Tipo C (Rígido PLLA/CHT), D (Flexible en PLLA/ CHT), H (Flexible en PLLA).

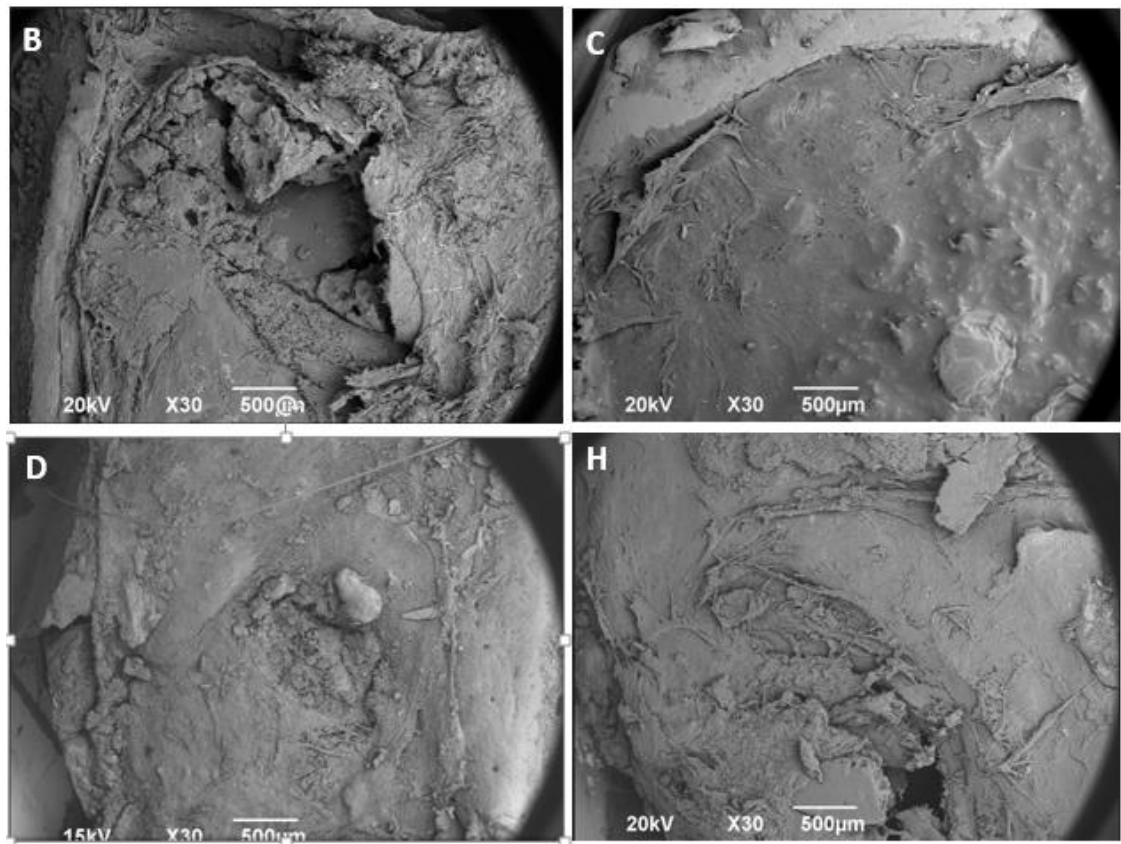


Figura 93. Andamios de PLLA injertados por 3 meses en hueso parietal de Ratas Wistar. B: Andamio rígido de PLA; C: Andamio rígido de PLLA con CHT; D: Andamio flexible de PLLA con CHT; H: Andamio flexible de PLLA. Técnica SEM.

Los andamios rígidos elaborados únicamente en PLLA, mostraron una superficie no homogénea, con abundantes depósitos cristalinos en su superficie; en la interfaz hueso andamio se observan osteoblastos y estructuras fibrilares que están uniendo el andamio al hueso periférico, (Fig. 94); al realizar análisis elemental mediante EDS se observa depósitos de calcio en la zona de la interfaz hueso andamio, lo que estaría indicando que el andamio está biointegrando y que la interfaz está en proceso de mineralización, (Fig. 95).

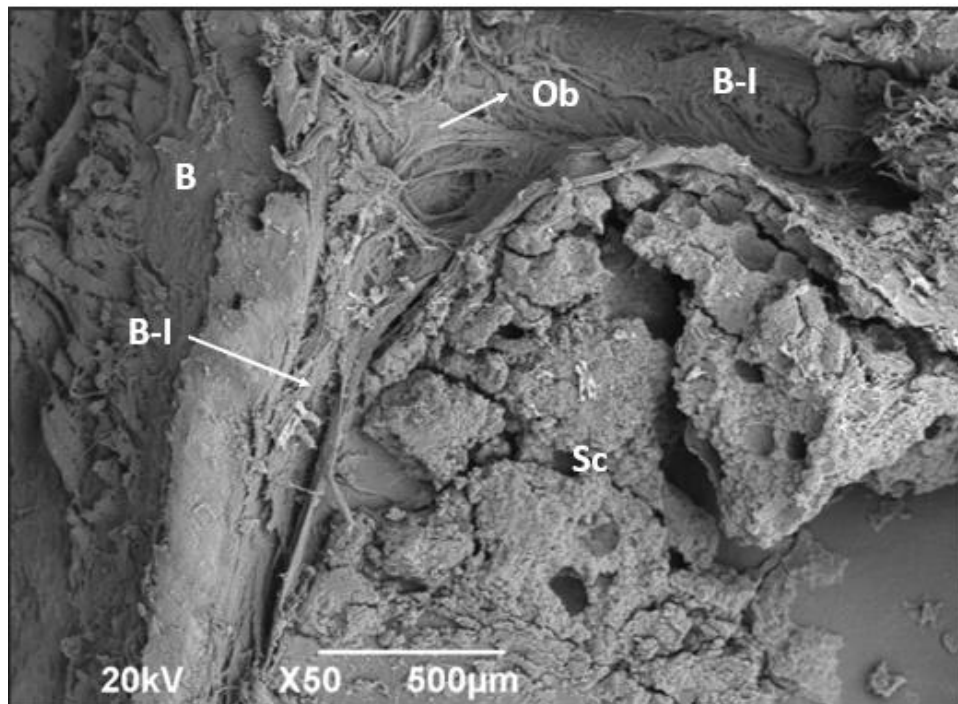


Figura 94. Andamio tipo B, injertado por tres meses en hueso parietal de rata. B: Hueso, Ob: Osteoblasto, B-I: Interfaz hueso implante, Sc: Andamio. Técnica SEM.

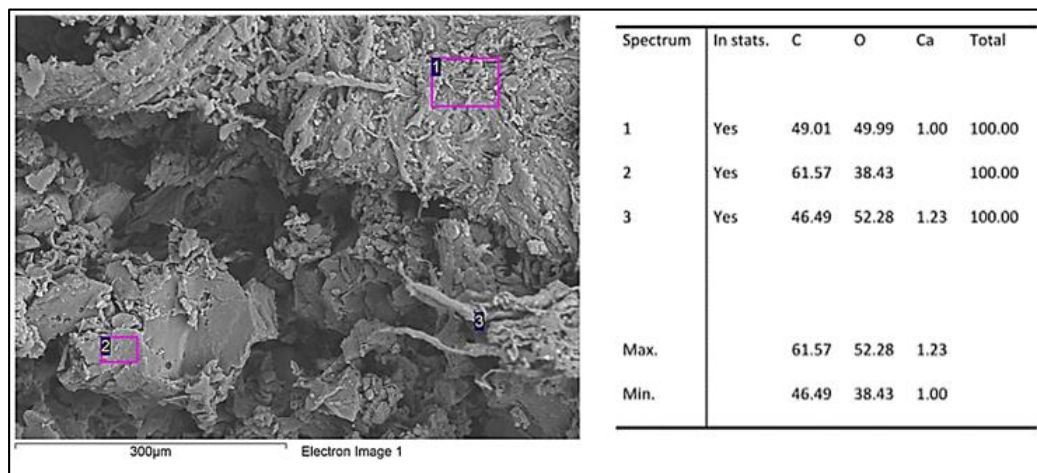


Figura 95. Análisis elemental de la interfaz hueso andamio, en un andamio tipo B. Magnificación 200X. Técnica SEM / EDS.

En contraste con los andamios elaborados solo en PLLA, los andamios tipo C (PLLA/CHT), mostraron una superficie más homogénea, con sellado completo del defecto, (Fig. 96).

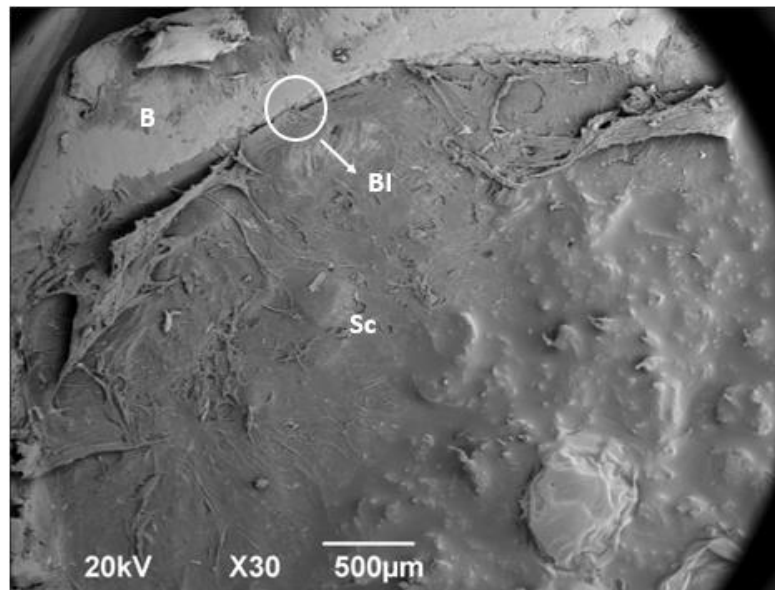


Figura 96. Andamio tipo C, injertado por tres meses en hueso parietal de rata. B: Hueso, B-I: Interfaz hueso implante, Sc: Andamio. Técnica SEM.

El análisis de la interfaz en el andamio tipo C, (círculo blanco en las 2 imágenes) muestra una interfaz activa con presencia de osteoblastos que se anclan tanto al hueso periférico como a los poros del andamio y fibras que están biointegrando la estructura al hueso periférico, además se observa presencia de cristales en contacto con las fibras, (Fig. 97).

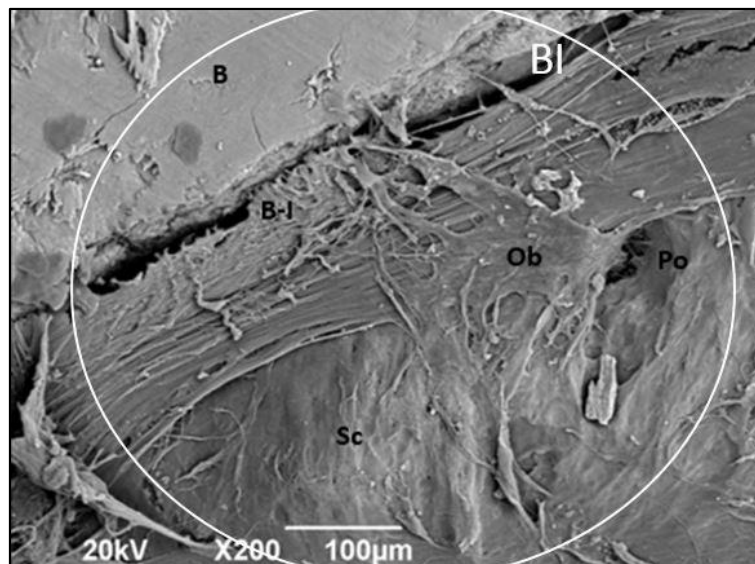


Figura 97. Interfaz hueso andamio en un andamio tipo C. B: Hueso periférico, B-I: Interfaz hueso andamio, Ob: Osteoblasto. Po: Poro. Sc: andamio. Técnica SEM.

En la figura 98 se presenta un análisis por EDS de la zona de la interfaz observándose presencia de calcio y fosforo, elementos constitutivos de la matriz ósea extracelular, tanto en el hueso periférico, como en la interfaz y en el andamio lo que está indicando un proceso de mineralización.

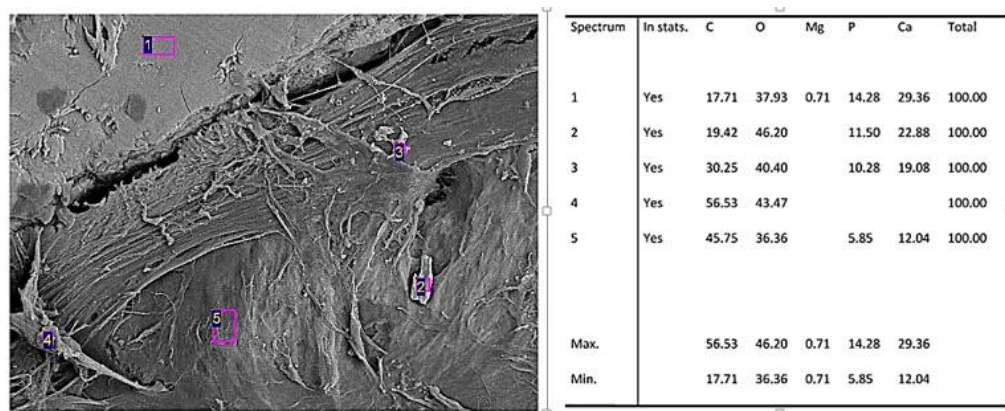


Figura 98. Interfaz hueso andamio en un andamio tipo C. El punto 1 corresponde a hueso periférico, el 2 al andamio, el 3 y 4 a la interfaz, el 5 a otro sector del andamio. Técnica SEM/EDS, Magnificación 200X. (2015).

Los andamios flexibles con quitosano (Tipo D) también muestran una interfaz activa con presencia de osteoblastos y fibras que unen el andamio con el hueso periférico, también se observa presencia abundante de cristales, (Figura 99)

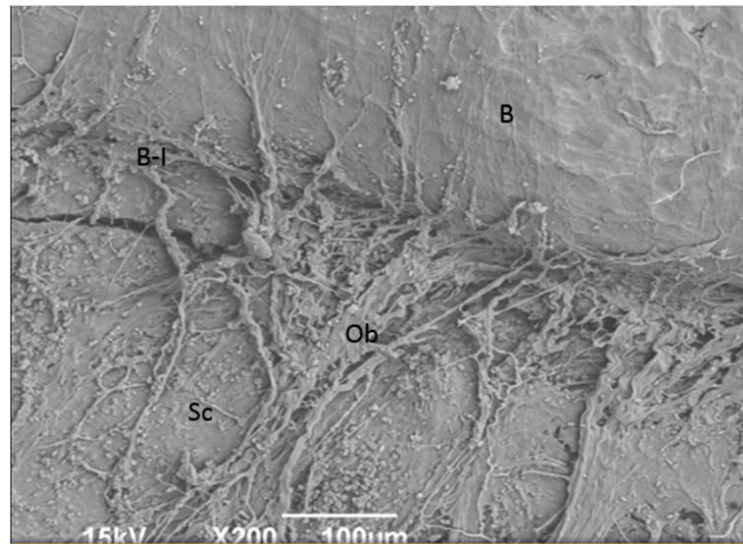


Figura 99. Interfaz hueso andamio en un andamio tipo D. B: Hueso periférico, B-I: Interfaz, Ob: Osteoblasto, Sc: Andamio. Técnica SEM, Magnificación 200X. (2015).

La caracterización por EDS de la interfaz mostró presencia de calcio tanto en el hueso periférico como en el andamio, Fig. 100.

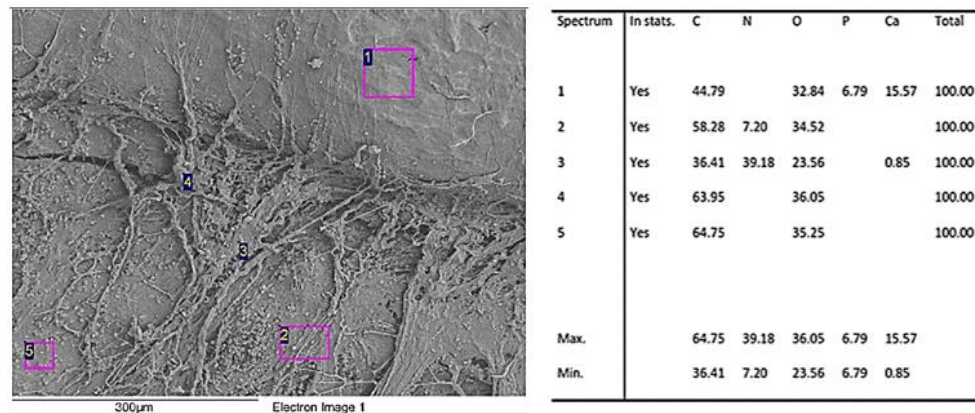


Figura 100.. Interfaz hueso andamio en un andamio tipo D. El espectro 1 fue determinado en el hueso periférico, 2, 3, 4, y 5 corresponden a posiciones sobre el andamio. Técnica SEM/EDS, Magnificación 200X. (2015).

Al igual que en los otros tipos de andamios, el andamio H (PLLA sin CHT), la interfaz hueso andamio también muestra estructuras fibrosas que unen el andamio al hueso, (Fig. 101).

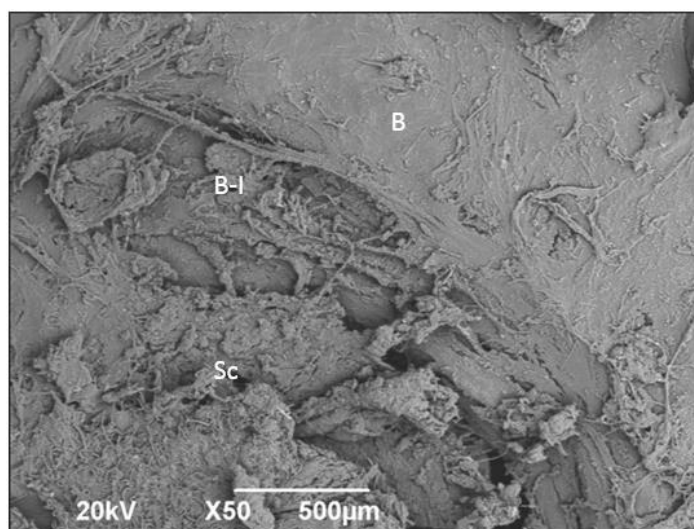


Figura 101. Interfaz hueso andamio en un andamio tipo H.

. B: Hueso periférico, Sc: Andamio. B-I: Interfaz Hueso andamio. Técnica SEM, Magnificación 200X. (2015).

El análisis elemental confirma la presencia de calcio tanto en el hueso periférico como en la interfaz y en el andamio mismo, (Fig. 102)

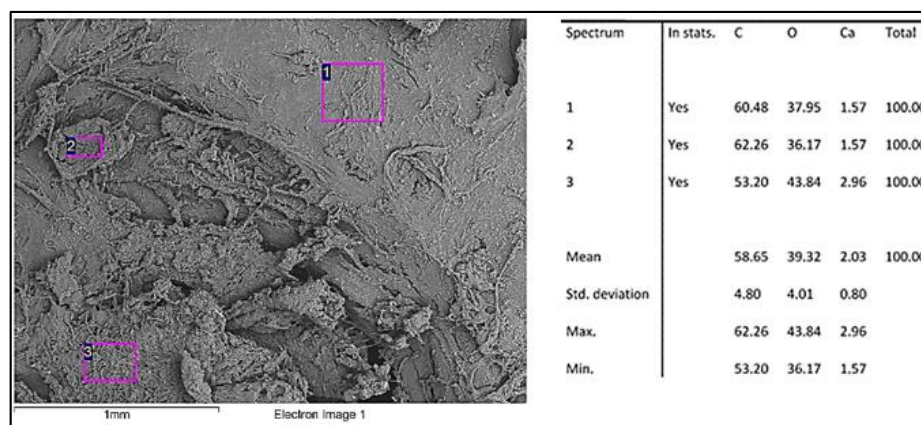


Figura 102. Interfaz hueso andamio en un andamio tipo H. El espectro 1 fue determinado en el hueso periférico; 2, en la interfaz y el 3 corresponden a una posición sobre el andamio. Técnica SEM/EDS, Magnificación 200X. (2015).

Como ya se visualizó en la figura 93, los 4 tipos de andamios muestran diferencias en cuanto a la textura de la superficie; los tipos C y D parecen ser más eficaces en lograr una superficie más homogénea y un mayor cierre del defecto; pero todos tienen en común presentar biointegración al hueso periférico

lo que se manifiesta en la presencia de osteoblastos, fibras y elementos de la matriz extracelular al hacer el análisis de la interfaz.

Las diferencias encontradas mediante la microscopia electrónica (SEM) se pueden explicar por la presencia de quitosano que actuó como un “activador” de los procesos celulares en la etapa *in vitro*, lo cual se demostró estadísticamente mediante la regresión logística (Tabla 2).

Al cultivar los andamios con osteoblastos se logró el depósito de matriz extracelular, obteniéndose unas “matrices celulares sintéticas” que mostraron diferencias en cuanto al llenado de poros y presencia de producido celular (depósito de material) para el caso de los andamios rígidos y en el caso de los andamios flexibles en la presencia de fibras colágeno y en el producido celular (depósito de material).

Las imágenes obtenidas por SEM muestran que al ser implantadas se continúa el proceso de neo formación ósea en todos los 4 tipos de andamios, pero se conserva la tendencia vista desde la fase *in vitro* que los que contienen quitosano logran un sellado más rápido de la superficie, mostrando un mayor cierre del defecto.

En cuanto a los análisis por EDS de la superficie del andamio y de las interfaces se observa un proceso de mineralización con participación de osteoblastos, y fibras asociadas a iones calcio y fósforo.

Al igual que para los resultados de la fase de microscopia electrónica SEM *in vitro* se quiso estudiar la posible influencia del quitosano en la regeneración de los defectos, para esto se compararon los andamios rígidos con y sin quitosano entre sí, al igual que los andamios flexibles con o sin quitosano de acuerdo a las siguientes variables de respuesta: Evidencia Regeneración defecto óseo, tipo de cicatrización (fibrosa o regeneración), Cierre completo defecto, Superficie sellada 60 %, estructuras celulares identificables, Persistencia estructura polimérica, Presencia fibras colágeno, Depósito de matriz extracelular, Presencia elementos matriz extracelular en superficie, Presencia elementos matriz extracelular en interfaz.

Para el análisis estadístico se desarrolló un modelo de regresión logística con las características descritas previamente para la fase *in vitro*, mostrando que solo existe una correlación positiva en los andamios rígidos para las variables: Regeneración del defecto óseo, tipo de cicatrización, Persistencia de estructura polimérica, presencia de fibras colágeno, depósito de matriz extracelular y presencia de elementos de la matriz en la superficie.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la regresión, encontrándose que la influencia del quitosano se dio en forma casi similar para los dos tipos de andamios, siendo particularmente importante la influencia sobre la regeneración ósea, el tipo de cicatrización y la presencia de fibras colágeno.

Tabla 3. Análisis de la influencia del quitosano en la regeneración ósea en andamios de ácido poliláctico bioactivados, Fase *in vivo*.

Variable	Devianza			
	In vivo Rígido		In vivo Flexible	
Evidencia Regeneración defecto óseo	3,00E-04	✓	2,37E-04	✓
Cicatrización fibrosa	3,00E-04	✓	2,37E-04	✓
Cierre completo defecto	1,53E+07	✗	9,56E+06	✗
Sup sellada 60 %	1,53E+07	✗	1,90E+07	✗
estructuras celulares identificables	1,35E+07	✗	1,86E+07	✗
Persistencia estructura polimerica	3,00E-04	✓	2,07E+07	✗
presencia fibras colágeno	3,00E-04	✓	2,37E-04	✓
Deposito de matriz extracelular	3,00E-04	✓	2,37E-04	✓
Presencia elementos matriz extracelular en superficie	3,00E-04	✓	2,37E-04	✓
Presencia elementos matriz extracelular en interfaz	6,88E+06	✗	2,37E-04	✓
Grados de libertad	8		4	
$\chi^2_{(5\%)}$	2,73264		0,710723	

Los resultados de la prueba de regresión logística realizada explica la observación de las diferencias en las imágenes obtenidas mediante SEM de los 4 tipos de andamios y muestran que los andamios elaborados en PLA-CHT al lograr mayor ventaja en la fase *in vitro* tuvieron un mejor desempeño en la fase *in vivo*.

3.5.2.2. Análisis mediante Técnicas Histoquímicas

La observación de fibras tanto en la interfaz como en la superficie misma del andamio llevó a la necesidad de su caracterización, con este fin se realizaron tinciones con Hematoxilina Eosina (H&E) y preparaciones especiales para colágeno tipo I (Tricromía de Masson) y para colágeno tipo III (Tricromía de Gomori).

En la figura 103 se pueden apreciar cortes histológicos de hueso parietal de rata wistar adulta que han sido injertados con los 4 tipos de andamios (B, C, D, H).

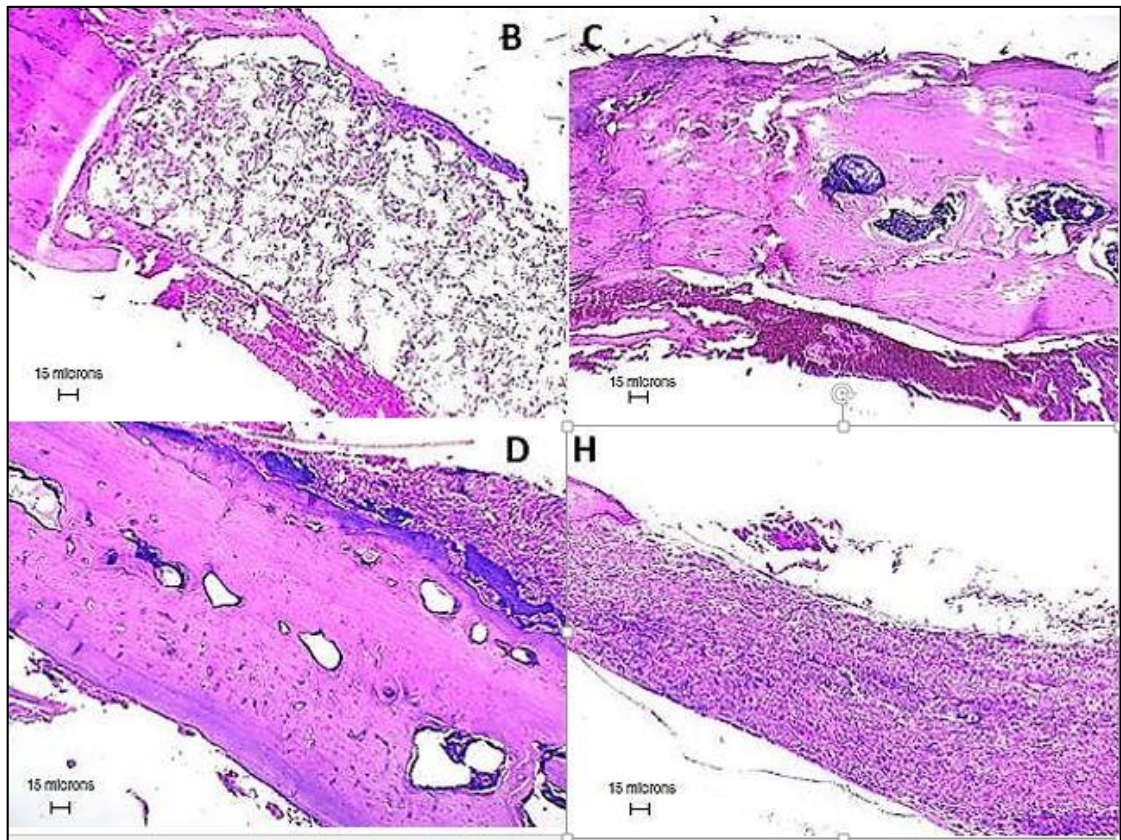


Figura 103. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con una matriz sintética de PLLA. Técnica H&E. 4X. (B. Andamio rígido de PLLA; C: Andamio rígido de PLLA-CHT; D: Andamio flexible de PLLA-CHT; H: Andamio flexible de PLA)

Se prepararon diferentes muestras de tejido óseo injertadas con los 4 tipos de andamios para visualizar la presencia de fibras colágeno tipo I y III, mediante técnicas estándar y cortes de 5 micrómetros de grosor.

En la figura 104 es posible observar un corte conteniendo un andamio tipo B, (solo PLLA), mediante tinción por Tricromía de Masson (TM) se identifican fibras de color azul correspondientes a colágeno tipo I, que rodean al andamio y parecen ser continuación del periostio, las fibras corren paralelas al área de corte.

En la zona del andamio se observan algunos puntos azules que corresponden a fibras colágeno tipo I que estarían penetrando el andamio. En la superficie meníngea, próxima a la interfaz izquierda se observan dos sitios de neo formación ósea (con color rojo).

La figura 105 corresponde a un corte del mismo tejido, teñido con Tricromía de Gomori (TG) para visualizar el colágeno tipo III (fibras reticulares); al igual que el colágeno tipo I, este también está participando en el tejido fibroso que rodea al

andamio, parece provenir del periostio y la distribución es paralela a la superficie de corte; sin embargo a diferencia del colágeno tipo I se encuentran numerosas fibras penetrando al andamio.

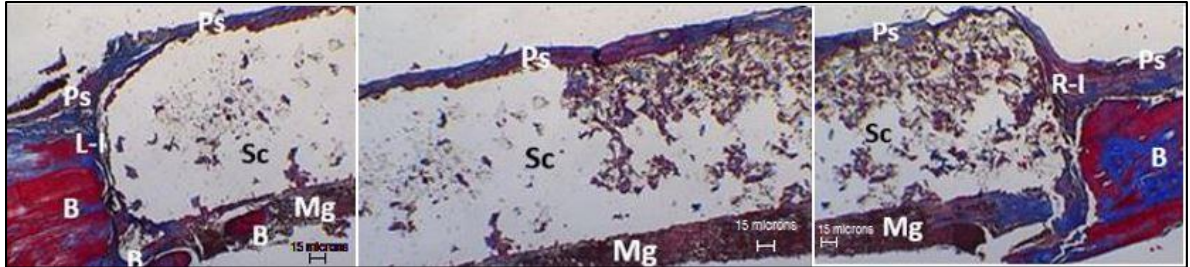


Figura 104. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo B. Técnica Tricromía de Masson. 4X. La imagen de la izquierda corresponde a la interfaz izquierda (L-I); en el centro la zona del andamio (Sc), a la derecha la interfaz derecha (R-I). Ps. Periostio; B: Hueso periférico; Mg: Superficie meníngea; Sc: Andamio.

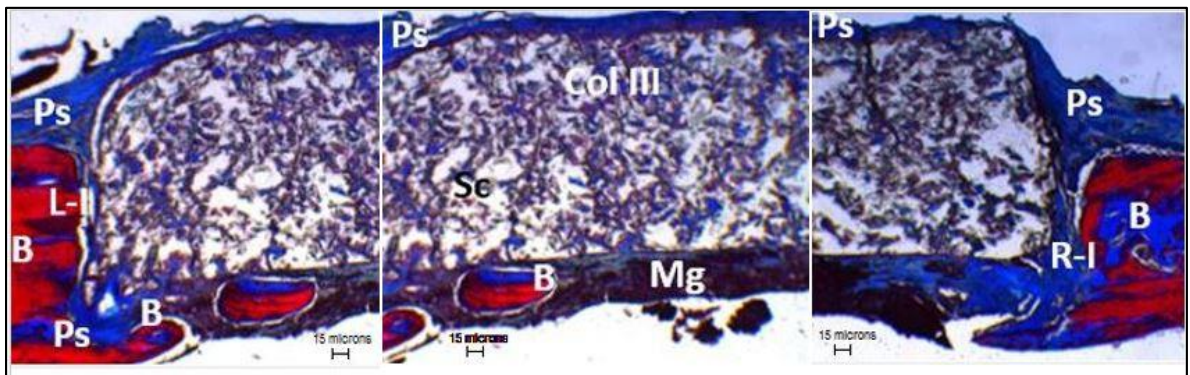


Figura 105. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo B. Técnica Tricromía de Gomori. 4X. La imagen de la izquierda corresponde a la interfaz izquierda (L-I); en el centro la zona del andamio (Sc), a la derecha la interfaz derecha (R-I). Ps. Periostio; B: Hueso periférico; Mg: Superficie meníngea; Sc: Andamio, Col III: Colágeno tipo III.

Al aplicar las dos técnicas a dos cortes del mismo tipo de andamio injertado, se observó una tinción más fuerte y en mayor cantidad de colágeno tipo III y a pesar que los dos tipos de colágeno están conformando la capa fibrosa que rodea al andamio, es claro que hay más fibras reticulares penetrando al andamio, lo que se explica porque el colágeno tipo III aparece antes del tipo I, siendo más común en tejidos óseos inmaduros a diferencia del tipo I que es casi hegemónico en tejido maduro.

En las muestras que contienen andamios tipo C (PLLA- CHT), se puede observar un proceso cicatrizal distinto; a diferencia de lo que ocurre con los andamios tipo B, donde después de 3 meses todavía es posible identificar el andamio y la presencia de las interfaces hueso andamio; en los que se elaboraron con PLLA- CHT las

interfaces desaparecen y el remplazo por tejido óseo nuevo es mayor observándose una resorción de tipo centrípeta con persistencia del material polimérico en el centro. La resorción de tipo centrípeta consiste en una erosión superficial que lleva finalmente a la fragmentación del andamio, ocurriendo una progresiva fragmentación del andamio en la medida en que avanza la degradación hidrolítica; este patrón de degradación ya había sido reportado por Valencia, C.H; et al. (83),(84), en el año 2008 en un estudio *in vivo* en conejos con andamios de ácido poliláctico de bajo peso molecular.

La figura 106 corresponde a un andamio tipo C en el centro de la preparación ósea, es posible identificar 3 zonas según el grado de degradación/resorción y remplazo; en la zona 1 (Z1) persiste una cantidad grande de la estructura polimérica (PLLA-CHT) en proceso de degradación, en la superficie meníngea; la zona 2 (Z2), corresponde al centro del andamio, se observa la estructura polimérica fragmentada en porciones muy pequeñas y en proceso de degradación; la zona 3 (Z3) corresponde a la mayor parte del andamio y se observa con características de un tejido óseo en proceso de maduración con presencia de lagunas osteocitarias, con la tinción de Tricromías (Gomori y Masson) la tinción de color azul se hace más notoria en las zonas donde se está formando tejido, indicando la presencia de los dos tipos de colágeno.

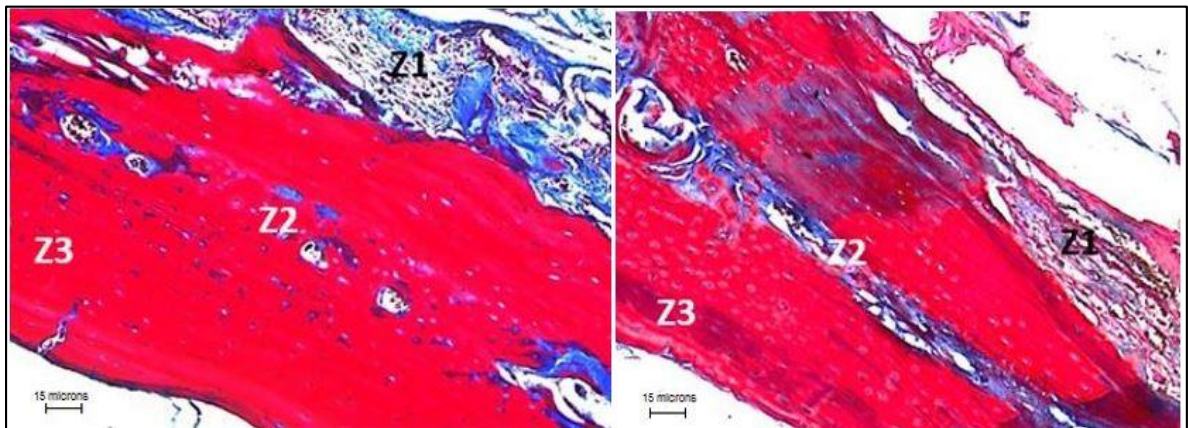


Figura 106. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo C. A la izquierda Técnica Tricromía de Gomori a 10X, a la derecha técnica de Masson a 10X. Las imágenes corresponden a la zona del injerto. Z1: Presencia de estructura polimérica; Z2: Partículas de PLLA en proceso de degradación; Z3: zonas donde el PLLA se degradó y fue remplazado por tejido óseo.

En el caso de los andamios flexibles después de 3 meses todavía persisten fibras de PLA; en estas muestras es posible identificar 4 zonas según su apariencia histológica; la zona 1 (Z1) corresponde a una zona con presencia de fibras poliméricas identificables; la zona 2 (Z2) corresponde a una interfaz donde el tejido óseo se está formando en medio de la matriz sintética y por lo tanto es muy rica en

colágeno tipo I; la zona 3 se ubica en el centro del tejido neo formado y corresponde a porciones fibrilares en proceso de degradación y reemplazo; en la zona 4 se aprecia un tejido óseo neo formado con características de normalidad, intercalado en las diferentes zonas se encontró tinción positiva para colágeno tipo I, (Figura 107).

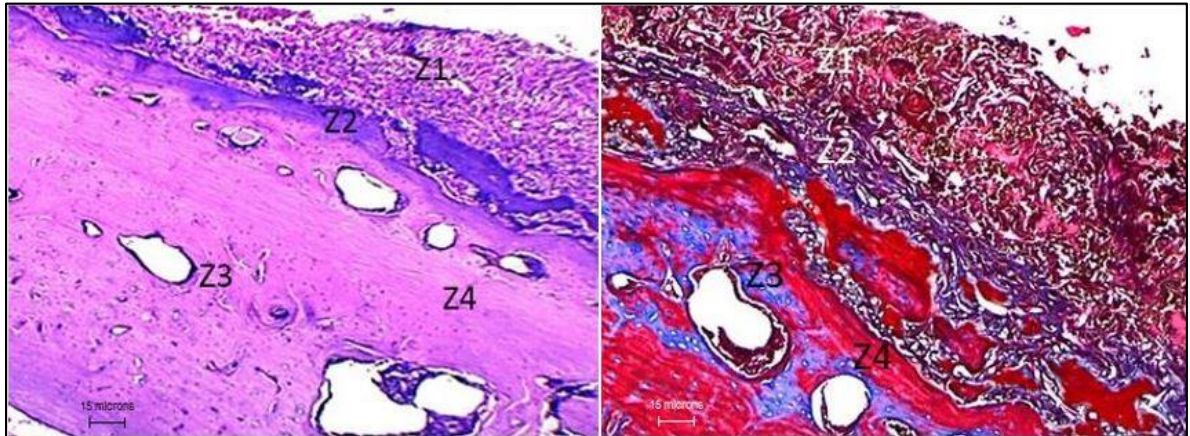


Figura 107. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo D. A la izquierda Técnica Hematoxilina Eosina a 10X, a la derecha técnica de Masson a 10X. Las imágenes corresponden a la zona del injerto. Z1: Presencia de estructura polimérica; Z2: formación de tejido óseo entre las fibras poliméricas; Z3: zonas donde el PLLA está siendo; Z4: Tejido óseo neo formado.

Los andamios tipo H presentaron después de los 3 meses de implantación una gran cantidad de fibras poliméricas sin degradarse, sin embargo utilizando tinciones tricrómicas se observó la presencia de una fuerte tinción positiva para colágeno tipo I tanto en el hueso neo formado como en los espacios interfibrilares del andamio; a una magnificación de 10X se observa como fibras colágeno tipo I están penetrando el andamio actuando como *septa* que separan porciones donde se está formando tejido óseo, las fibras son paralelas a la superficie de corte y parecen provenir del periostio y del hueso periférico. (Figura 108).

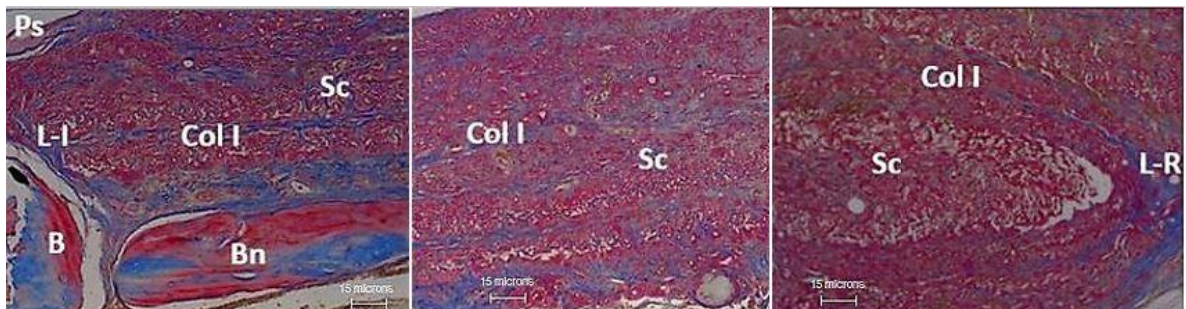


Figura 108. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo H.. En el centro se aprecia la zona injertada, en los extremos las dos interfaces hueso implante. Ps: Periostio; B: Hueso periférico; L-I: Interfaz izquierda; Sc: Andamio; Bn: Hueso neo formado; L-R: Interfaz derecha. Técnica Tricrómica de Masson a 10X.

Cuando se realiza tinción por Tricrómica de Gomori a un corte histológico proveniente de la misma muestra se observa para el colágeno tipo III una situación igual a la descrita en el párrafo anterior para el colágeno tipo I, (Figura 109).

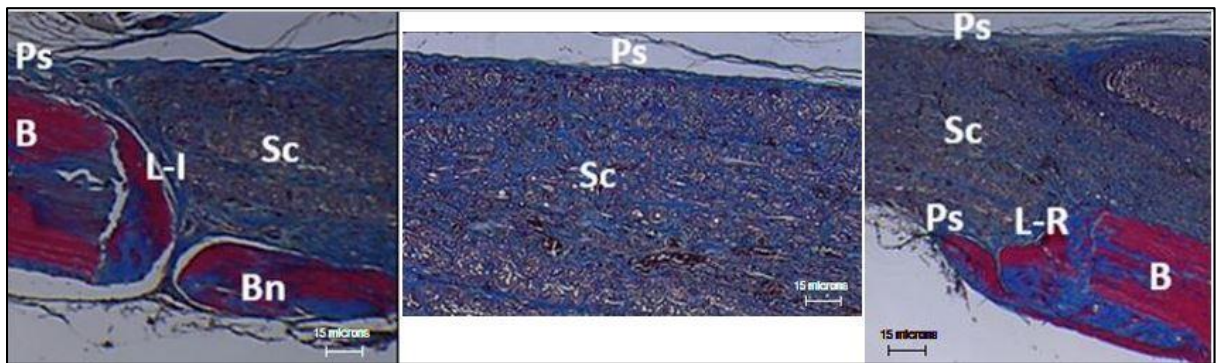


Figura 109. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo H. En el centro se aprecia la zona injertada, en los extremos las dos interfaces hueso implante. Ps: Periostio; B: Hueso periférico; L-I: Interfaz izquierda; Sc: Andamio; Bn: Hueso neo formado; L-R: Interfaz derecha. Técnica Tricrómica de Gomori a 10X.

El Colágeno tipo III es considerado un precursor en el ensamble de la matriz ósea extracelular y podría estar relacionado con la osteoblastogenesis; su presencia se describe como muy fuerte en hueso inmaduro y de menor proporción en el tejido maduro, (85); actualmente se acepta que el colágeno tipo III persiste en el tejido óseo maduro acompañando al colágeno tipo I, (49), y en la unión del periostio al hueso, (85).

Si se tiene en cuenta que el colágeno tipo III es prerequisite para el depósito del tipo I y regula la osteoblastogenesis y la formación de hueso trabecular (85) y que el colágeno tipo I es el que da la estructura para el ensamble de la matriz ósea extracelular (86), (87), se puede afirmar que en el interior del andamio tipo H también se está dando un proceso de neo formación ósea.

En los análisis de interfaces también es importante determinar lo que está ocurriendo a nivel histológico entre el material (ácido poliláctico) y las células presentes en el tejido, debido a que esta interacción es la que determina la bioresorción del material y la posibilidad o no que el material sea remplazado por tejido óseo.

Como ya se mostró, los andamios rígidos tipo B (PLLA) han sido incorporados al hueso periférico mediante un proceso de biointegración con participación de fibras colágeno (Tipos I y III) y mediante el depósito de cristales de calcio, sin embargo la apariencia del andamio siendo muy parecida a la del andamio original pero con evidencias de penetración de fibras colágeno Tipo I y III en su interior. A mayor aumento se observa la estructura fibrosa que rodea en andamio y en el interior cristales de PLLA sin degradar y entre ellos pequeñas formaciones de tejido, tipo islas, (Fig. 110)

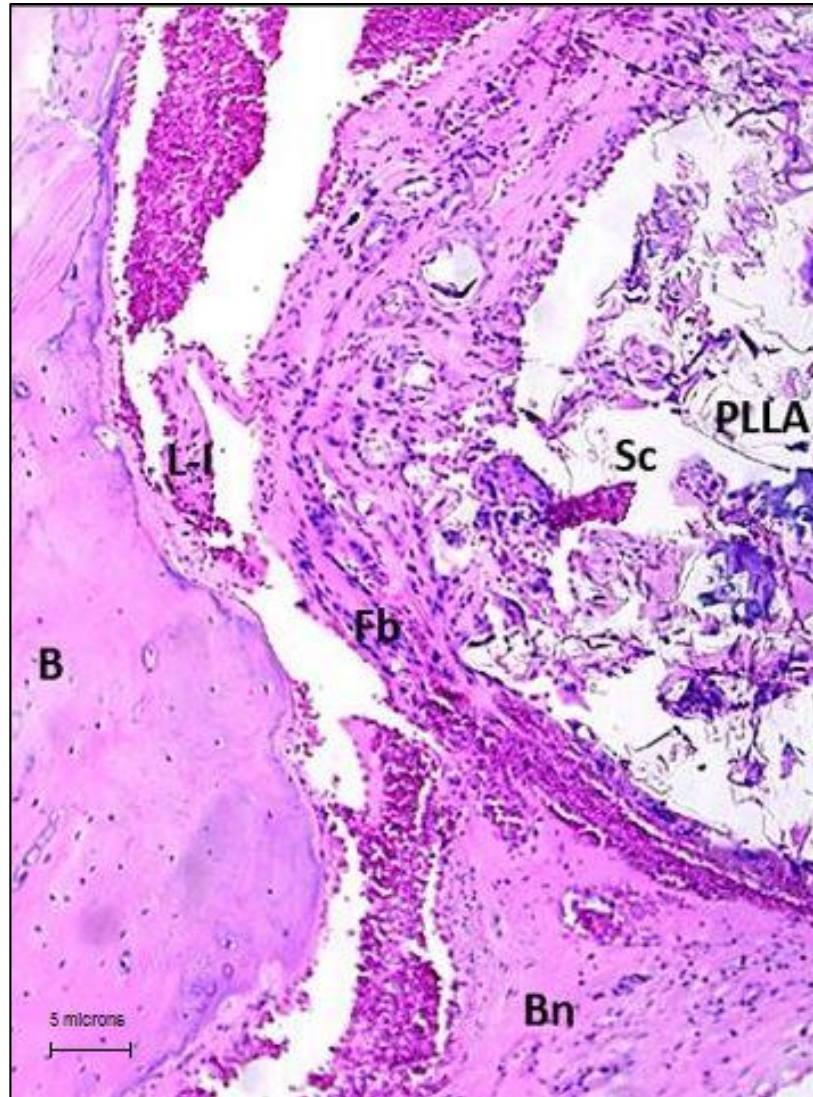


Figura 110. Zona de la interfaz Hueso andamio un andamio tipo B.; B: Hueso periférico; L-I: Interfaz izquierda; Fb: estructura fibrosa; Sc: Andamio; PLLA: Cristales de ácido poliláctico; Bn: Hueso neo formado. Técnica H&E a 40X.

Los resultados obtenidos para el andamio elaborado solamente con ácido poliláctico son muy similares a los reportados por Bustamante A; et al (2011) (88) quienes utilizando un modelo experimental similar injertan un andamio de PLLA - Fosfato de calcio, encontrando formación de una capa fibrosa rodeando el andamio, también identifican la presencia de fibras de colágeno tipo I y III en la interfaz y penetrando en el interior del mismo, (Fig. 111).

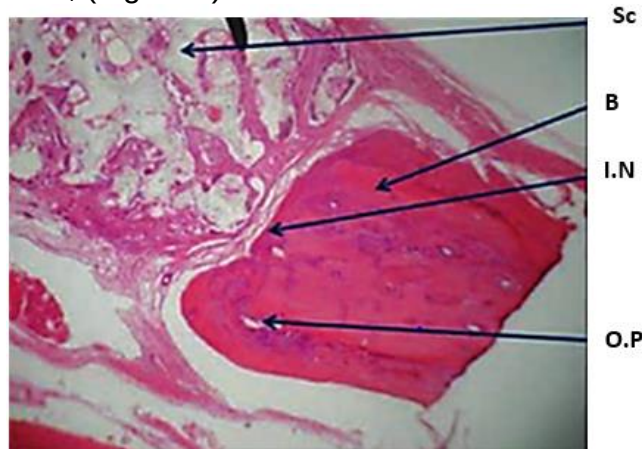


Figura 111 Zona de la interfaz Hueso andamio, andamio de PLLA- Fosfato de Calcio. Sc: Andamio PLLA- Fosfato tricalcico; B: Hueso periférico; I.N: Interfaz de neo formación (Línea de formación de nuevos osteoblastos); O.P: Osteona primaria. Técnica H&E a 20X. Fuente: Bustamante, A; et al. 2011

A diferencia de los andamios tipo B, en los elaborados en PLLA y CHT (Tipo C) la interfaz hueso andamio desaparece, al igual que la capsula fibrosa.

La resorción / aposición también se da mediante un patrón centrípeto, (Fig. 112, Imagen 1), permaneciendo solo algunos cristales en el centro del andamio en proceso de degradación por una fuerte actividad celular como se puede observar en las imágenes 2 y 3 de la figura 112.

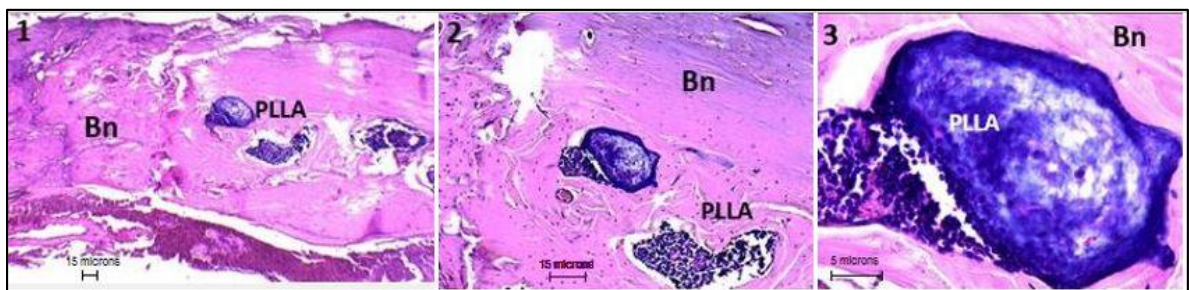


Figura 112. Andamio tipo C después de tres meses de implantación.; Bn: Hueso neo formado; PLLA: Cristales de ácido poliláctico. Técnica H&E a 4X (Imagen 1), 10X (Imagen 2) y 40X (Imagen 3).

Los fragmentos de material están rodeados por una pseudocapsula delimitada por células mixtas (mononucleadas y multinucleadas) que intentan degradar el material, (Fig. 113).

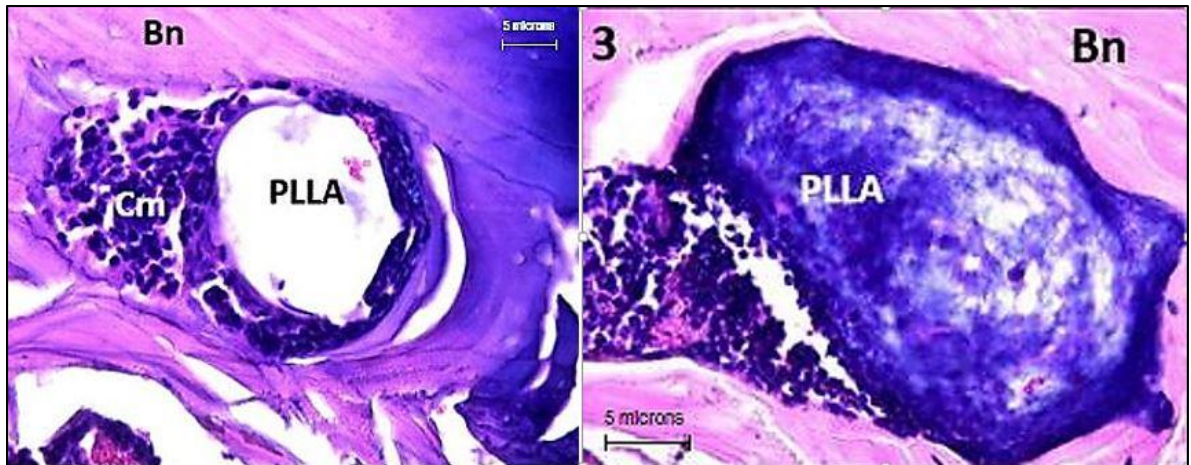


Figura 113. Andamio tipo C después de tres meses de implantación. Bn: Hueso neo formado; PLLA: Cristales de ácido poliláctico; Cm: Células mixtas. Técnica H&E a 40X

La figura 114 presenta cortes de la misma muestra (andamio tipo C) con tinción para colágeno tipo I, se observa fuerte tinción de color azul en el hueso neo formado con algo de tinción en el interior de la zona de degradación de cristales de PLLA.

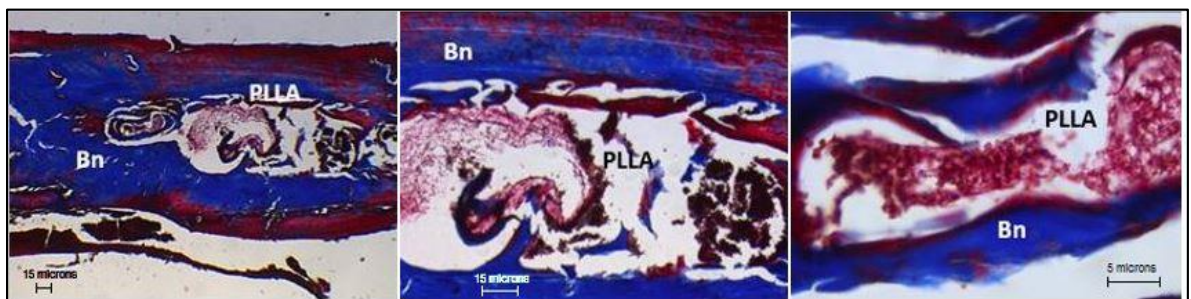


Figura 114. Andamio tipo C después de tres meses de implantación.; Bn: Hueso neo formado; PLLA: Cristales de ácido poliláctico. Técnica Tricrómica de Masson a 4X, 10X y 40X.

La figura 115 corresponde a un sector donde el material (PLLA) ya se degradó completamente y se está llevando a cabo el proceso de neo formación ósea, se observa hematopoyesis y presencia de monocitos, neutrófilos, megacariocitos.

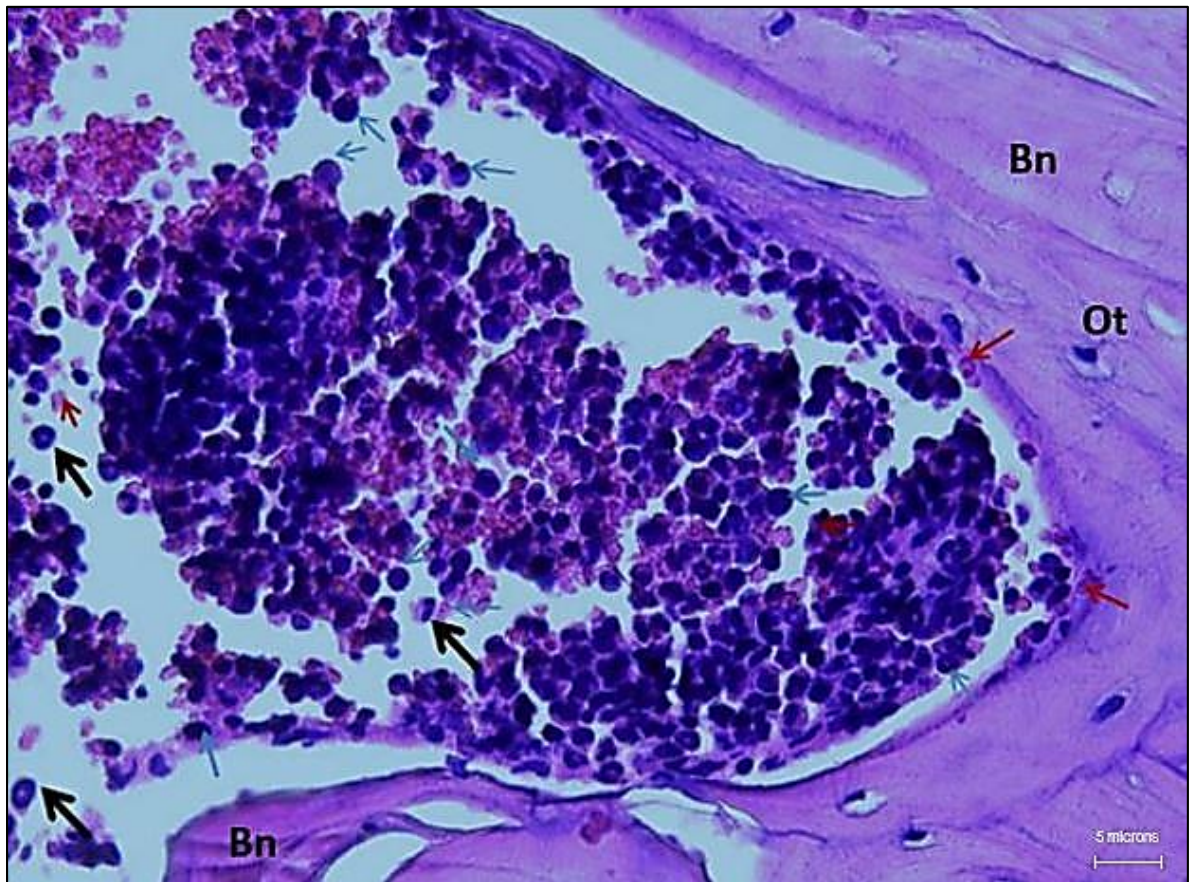


Figura 115. Andamio tipo C después de tres meses de implantación. Zona de neo formación ósea.; Bn: Hueso neo formado; Neutrófilos (Flecha negra); Monocitos (flecha azul); Megacariocitos (Flecha roja). Se aprecian abundantes eritrocitos (color rosado). Técnica H&E a 40X.

En los andamios flexibles tipo D (con CHT) es posible observar también varias zonas según el grado de degradación / resorción de las fibras y neo formación ósea. La figura 116 presenta una zona donde son apreciables las fibras poliméricas (Z1), la Z2 es una zona de interfaz entre una zona con material apreciable y otra en la que se está dando la degradación; la zona 3 (Z3) corresponde a un material en franco proceso de degradación con una fuerte actividad celular, muy similar al ya descrito para los andamios rígidos con quitosano, y la zona 4 (Z4) corresponde a zonas con características de normalidad (hueso neo formado).

En la figura 116 también es posible ver la degradación de las fibras en diferentes etapas, la Z3-1 corresponde a zonas donde ya se degradó el material y persiste el infiltrado celular mixto; en la zona Z3-2 el infiltrado es menor y en la Z3-4 el infiltrado es mínimo y se observa neo formación ósea; las siluetas de color blanco con forma ondulada corresponden a algunas fibras sin degradar.

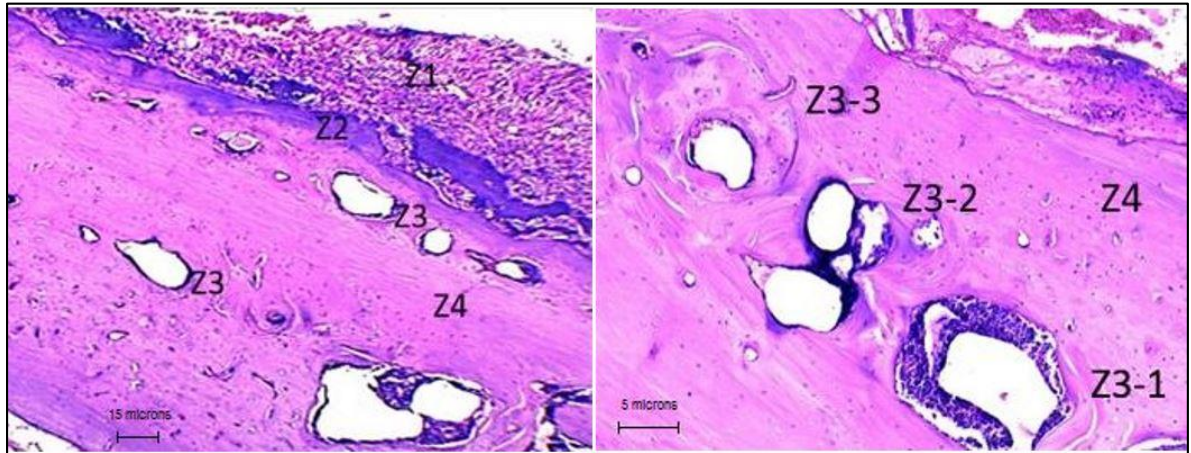


Figura 116. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo D. Técnica Hematoxilina Eosina. A la izquierda a la derecha a 10X; se aprecian las diferentes zonas descritas en el texto; a la derecha a 40X el material PLLA en diferentes etapas de degradación.

En las figura 117 y 118 se observa la zona Z1, con presencia de fibras de PLLA sin resorberse pero en proceso de degradarse y con fuerte actividad angiogénica y osteogénica.

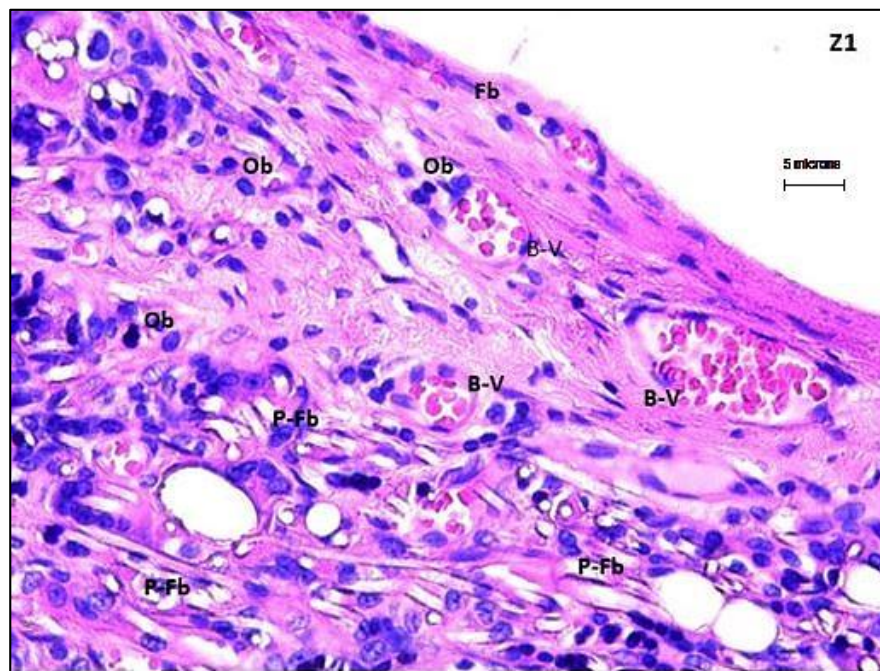


Figura 117. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo D. Técnica Hematoxilina Eosina, a 40X; se aprecian la zona Z1, descrita en el texto. Fb: Fibroblasto; Ob: Osteoblasto, P-Fb: Fibra de PLLA; B-V: Vaso sanguíneo.

La zona de interfaz (Z2) muestra como los espacios interfibrilares son ocupados por el infiltrado de células mixtas dándose la degradación/ resorción progresiva del material y su reemplazo por tejido neo formado con características de normalidad, como se aprecia en la figura 118.

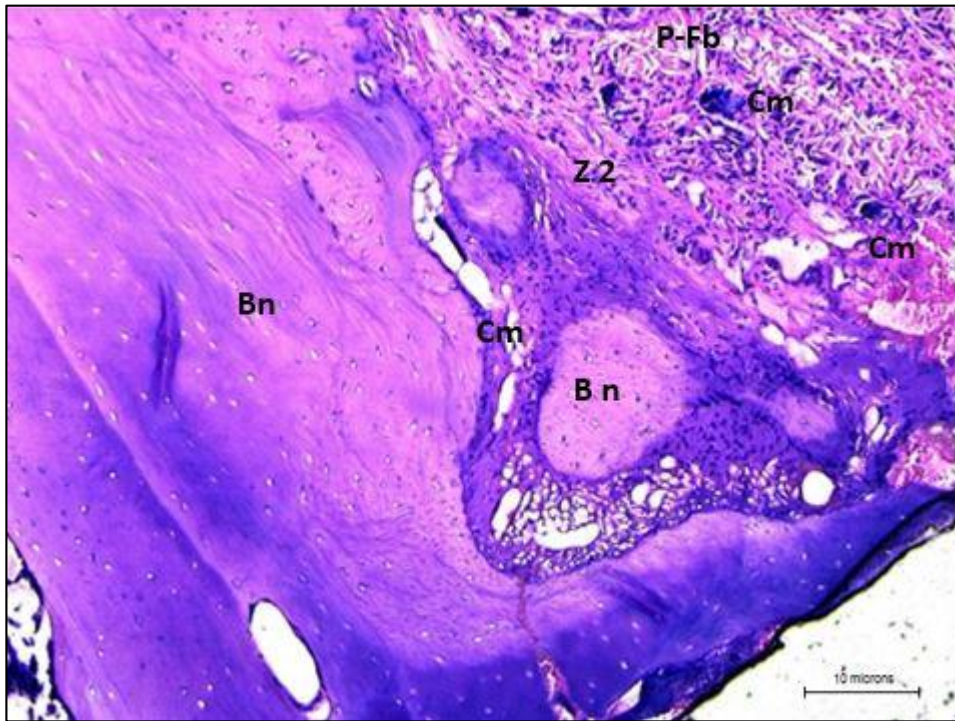


Figura 118. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo D.; se aprecian la zona Z2, descrita en el texto. Cm: Células mixtas; P-Fb: Fibras de PLLA; Bn: Hueso neo formado. Técnica Hematoxilina Eosina, a 40X.

Se evidencio la presencia de haces fibrosos en medio de las fibras poliméricas, los cuales tiñeron positivamente para colágeno tipo I y para colágeno tipo III. En la figura 119 se comparan dos zonas Z2 teñidos para colágeno tipo I (Tm) y Tipo III (TG) observándose presencia de los dos tipos en medio de las fibras poliméricas, pero aparentemente con mayor cantidad de fibras reticulares (Colágeno tipo III).

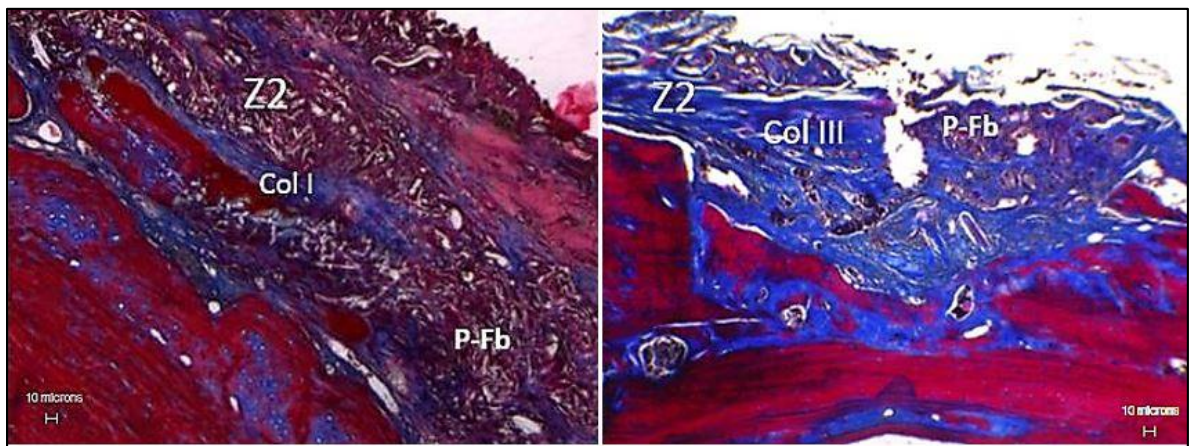


Figura 119. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo D. A la Izquierda técnica TM, a 4X, a la derecha técnica TG a 4X. Se aprecia la zona Z2, descrita en el texto. Col I: Colágeno tipo I; Col III: Colágeno tipo III; P-Fb: Fibras PLLA.

También es posible observar como en la zona de interfaz (Z2) hay infiltración de vasos sanguíneos en medio de las fibras poliméricas con persistencia en la zona de la neoformación ósea, (Fig. 120).

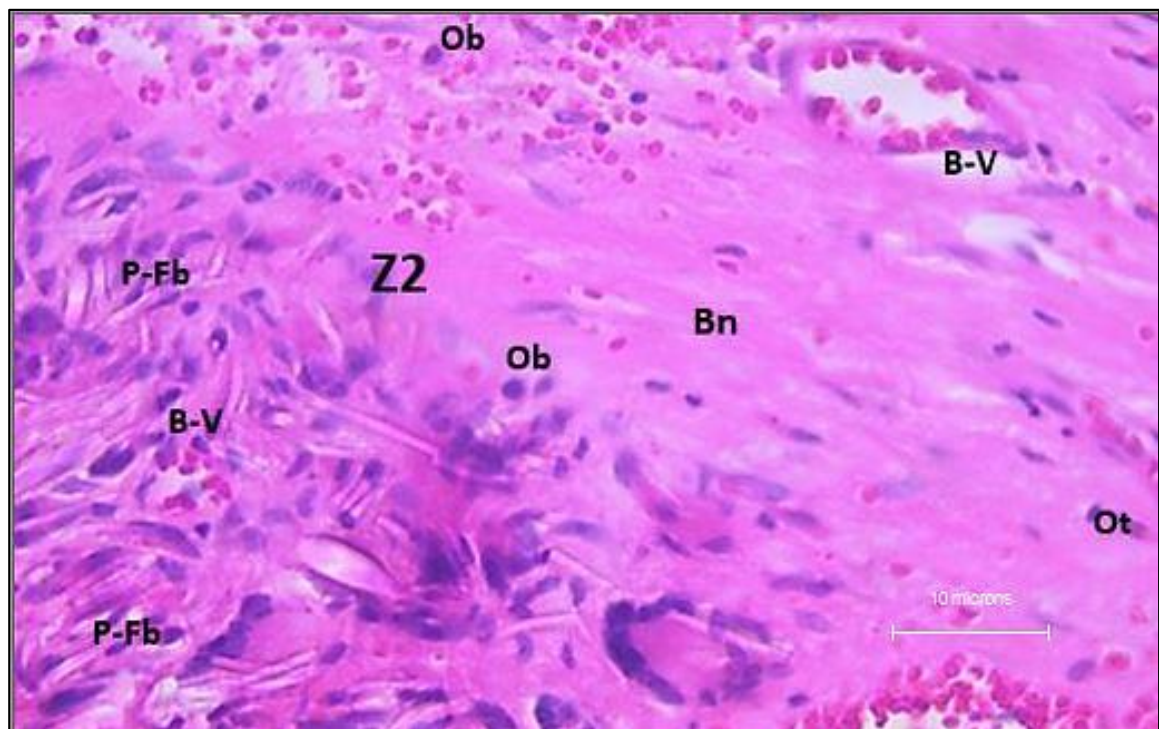


Figura 120. Andamio tipo D después de tres meses de implantación. Zona de la interfaz Z2. Ob: Osteoblastos, Fb: Fibroblastos; B-V: vaso sanguíneo; P-Fb: Fibras de PLLA. Técnica H&E a 40X.

Al completarse la resorción del material el tejido neo formado toma la apariencia del tejido óseo normal, la figura 121 muestra en la zona de interfaz Z3 unas estructuras compatibles con formación haversiana, en una presentación clásica de osteocitos alrededor de un canal central, rodeados por una línea de cemento, que sorprendentemente parecen osteonas; sin embargo este tipo de estructuras dejan de ser visible en la zona 4 (Z4) y no fueron un hallazgo común en la investigación, (aunque se encontraron estructuras similares en dos muestras tipo C y en una tipo D).

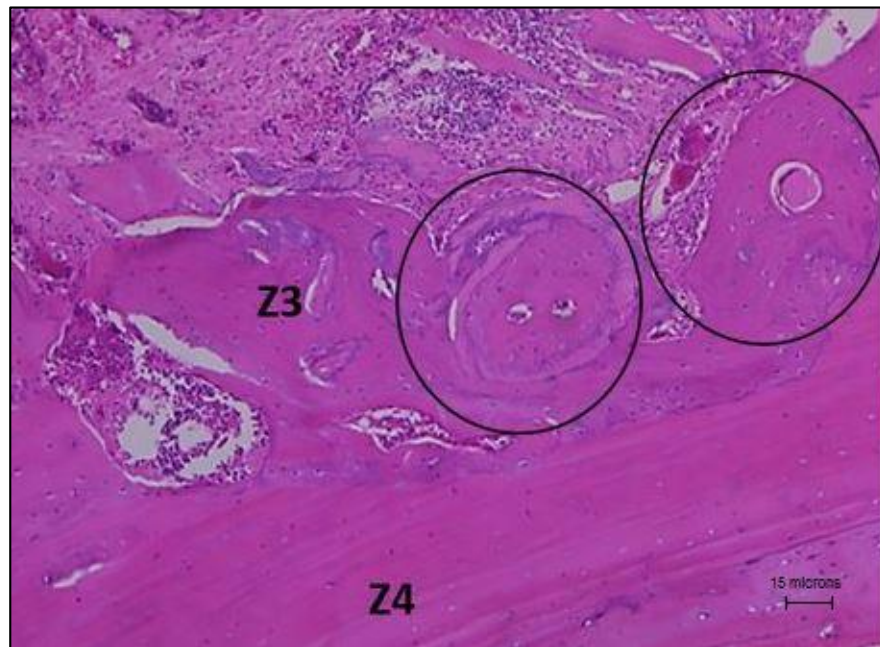


Figura 121. Andamio tipo D después de tres meses de implantación. Zona de la interfaz Z3. Técnica H&E a 10X. En círculos se observan estructuras que asemejan osteonas en formación.

El comportamiento de los andamios elaborados en PLLA sin CHT (tipo H) fue ligeramente diferente al descrito para el andamio tipo D. Lo primero que se observó es una mayor persistencia de fibras, pero también fue posible diferenciar algunas zonas: Una zona con abundante presencia de fibras poliméricas (Z1); una zona más celular y menos fibrilar (Z2) y la zona de hueso neo formado (Z3), (Figura 122).

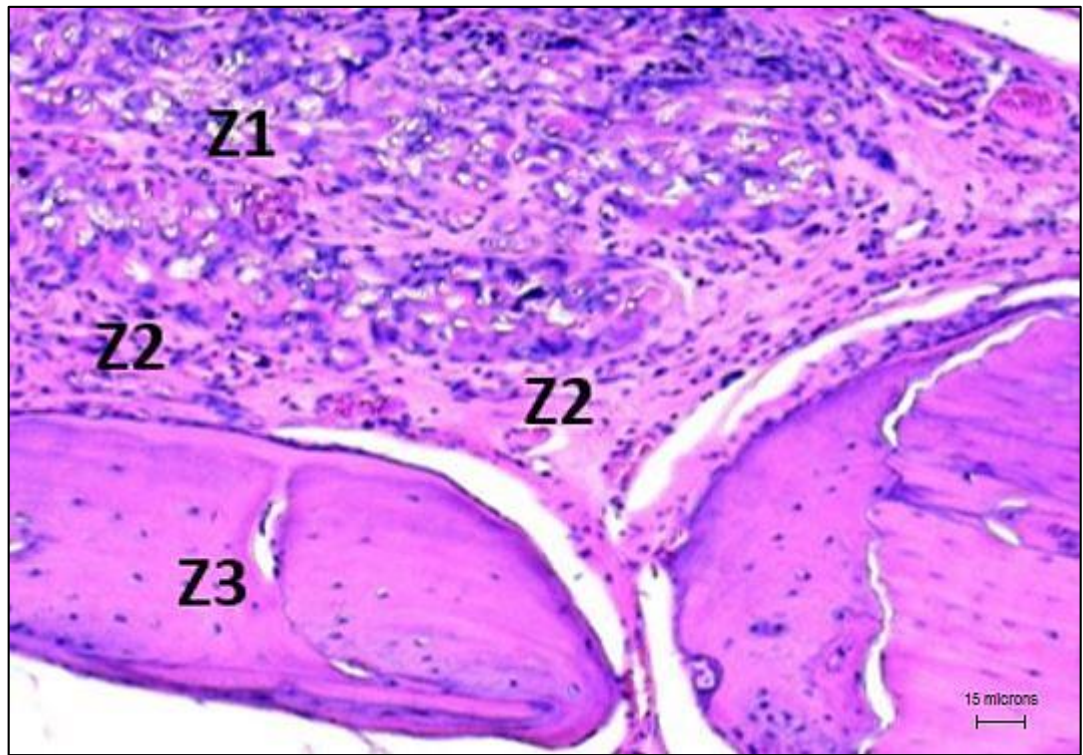


Figura 122. Andamio tipo H después de tres meses de implantación. Z1: Zona 1; Z2: Zona 2; Z3: Zona 3. Técnica H&E a 10X.

Utilizando tinciones para colágeno se observa como las fibras poliméricas en la zona 1 son separadas por haces de colágeno tipo I y tipo III, provenientes del hueso periférico, (Figura 123).

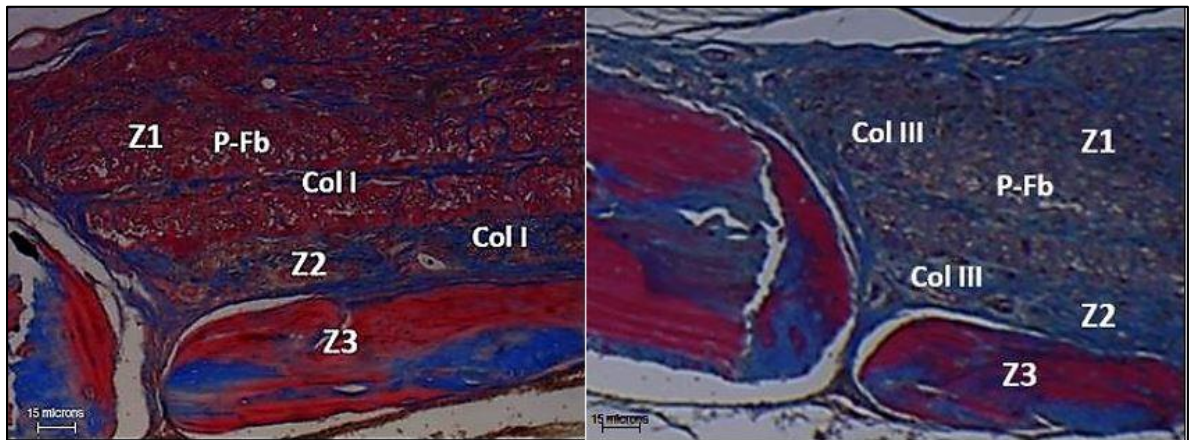


Figura 123. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo H. A la Izquierda técnica TM, a 10X, a la izquierda técnica TG a 10X. Se aprecia la zona Z2, descrita en el texto. Col I: Colágeno tipo I; Col III: Colágeno tipo III; P-Fb: Fibras PLLA.

A una mayor magnificación es posible observar abundantes vasos sanguíneos en la zona 1, (Fig. 124).

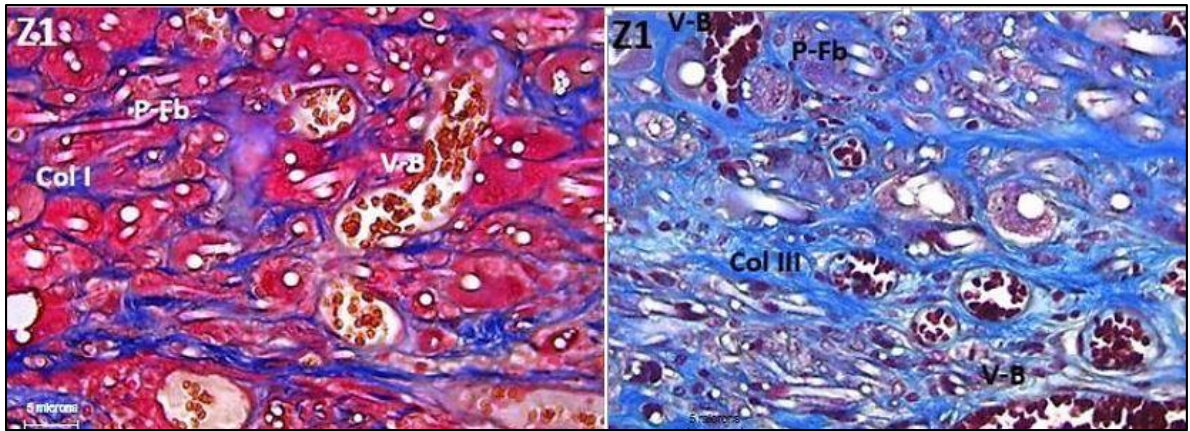
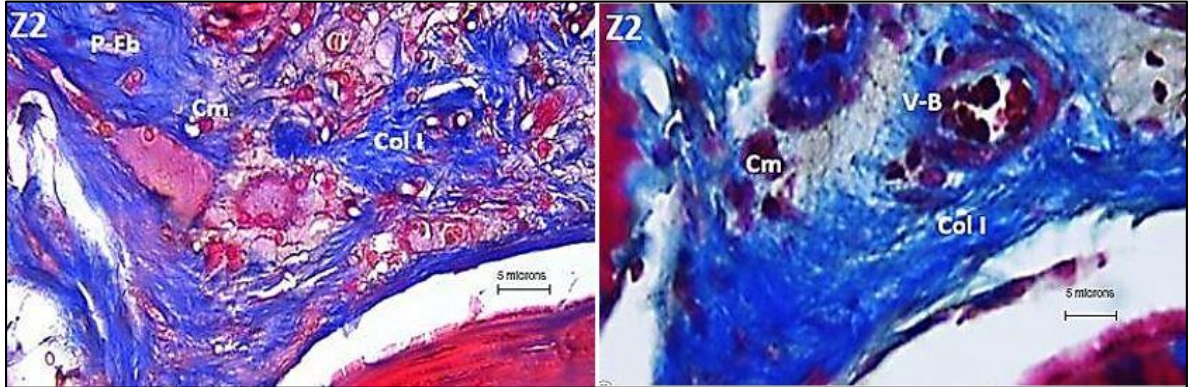


Figura 124. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo H. A la Izquierda técnica TM, a 40X, a la izquierda técnica TG a 40x. Se aprecia la zona Z1, descrita en el texto. Col I: Colágeno tipo I; Col III: Colágeno tipo III; P-Fb: Fibras PLLA; V-B: Vasos sanguíneos.

En la zona Z2, el número de fibras disminuye considerablemente, se observan células mixtas y abundantes vasos sanguíneos. (Fig. 125).



La zona Z3 corresponde a un hueso de características normales que se ha formado en la zona más basal de la preparación en contacto con la superficie meníngea; se observan numerosos osteocitos, Figura 126.

Figura 125. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo H. A la Izquierda técnica TM, a 40X, a la izquierda técnica TG a 40X. Se aprecia la zona Z2, descrita en el texto. Col I: Colágeno tipo I; Col III: Colágeno tipo III; V-B: Vasos sanguíneos; Cm: Células mixtas.

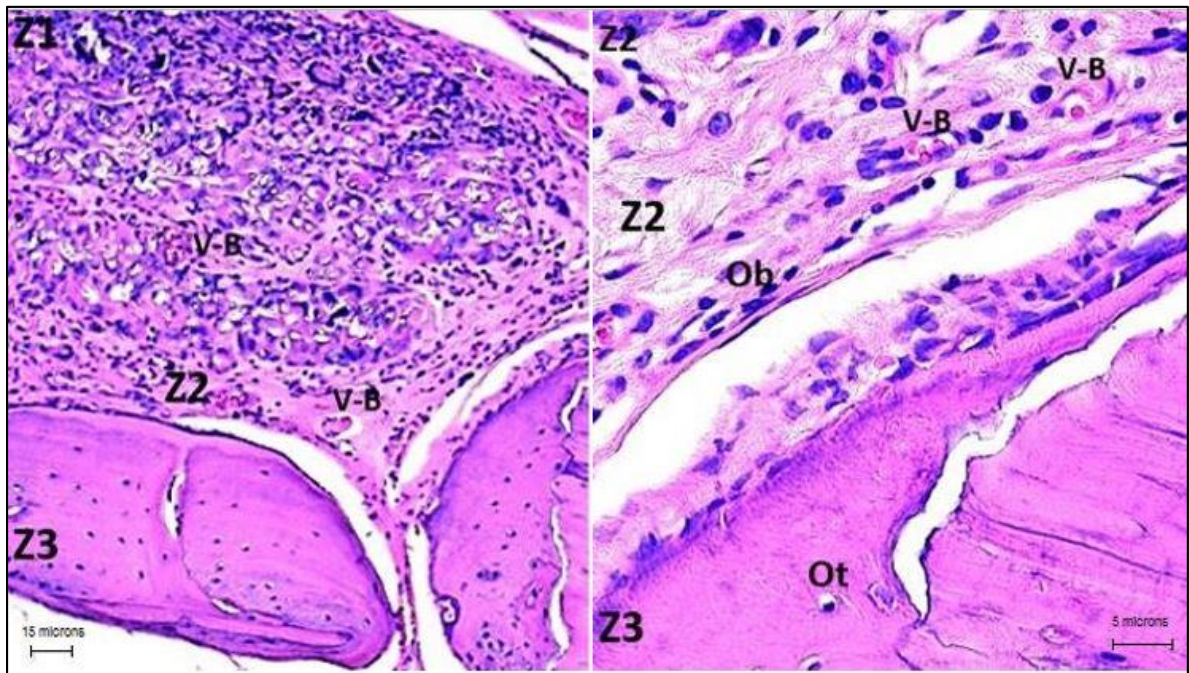


Figura 126. Hueso Parietal de Rata Wistar adulta injertado con un andamio tipo H. A la izquierda técnica H&E, a 10X, a la derecha técnica H&E a 40X. Se aprecian las zonas, descritas en el texto. Ob: Osteoblastos; Ot: Osteocitos; V-B: Vasos sanguíneos.

A partir de los resultados encontrados se plantean dos interrogantes que podrían orientar la discusión:

1. ¿Cómo se presentó el proceso de degradación / bioresorción?
2. ¿Cómo se están llevando a cabo los procesos de neo formación ósea?

El ácido poliláctico es un material que presenta degradación hidrolítica al estar en contacto con el agua y mediante este evento sus cadenas poliméricas se van rompiendo hasta quedar reducido a ácido láctico, CO₂ y H₂O los cuales son eliminados mediante procesos metabólicos .

En los estudios de degradación hidrolítica realizados a las muestras preliminares se encontró que el quitosano no tenía mayor influencia en la degradación y que inicialmente el PLLA presentaba una pérdida de masa muy alta en los primeros días.

Con base a la información obtenida en el ensayo de degradación hidrolítica se proyectó la pérdida de masa encontrándose que a 90 días está en un 30% y en 360 días se alcanza el 100%, (Fig. 127).

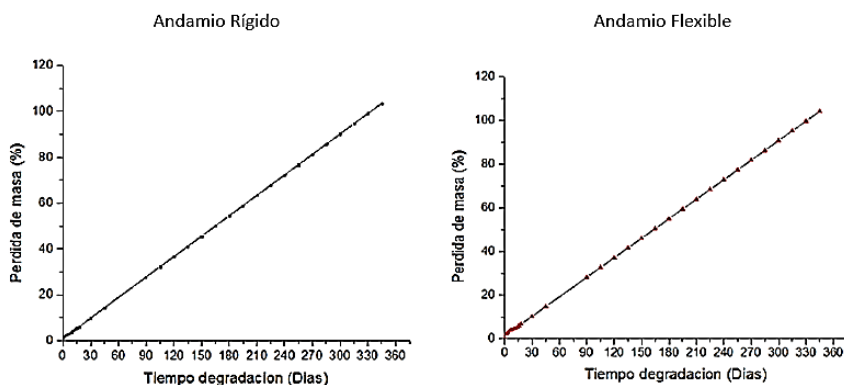


Figura 127. Proyección de la pérdida de masa por degradación hidrolítica *in vitro* en andamios de PLLA Rígidos y Flexibles

Los ensayos de degradación hidrolítica por su naturaleza *in vitro*, son un buen punto de partida para una investigación pero debe ser considerado como el valor más alto que podría demorarse el material en degradarse completamente y a partir de esta información tomar decisiones en cuanto a la incorporación de comonomeros o modificaciones adicionales de superficie que permitan acelerar el proceso si se considerara necesario.

En esta investigación se utilizó un PLLA de alto peso molecular para garantizar que sus propiedades mecánicas permitieran su procesamiento como andamios rígidos y como andamios flexibles, al utilizar un peso molecular alto también se tiene un porcentaje elevado de cristalinidad y por lo tanto se esperaría una degradación lenta.

Cuando se implanta el material en el tejido óseo el PLLA es degradado por el contacto con los fluidos y por actividad celular, pero además es resorbido por células inflamatorias lo que hace que el proceso sea más rápido.

La caracterización preliminar mostró una pérdida de masa importante en los primeros días, este es un comportamiento normal del material y se puede explicar porque la primera etapa de la hidrólisis se da inicialmente en las zonas amorfas que por su naturaleza desorganizada facilita la difusión de líquidos, mientras que la segunda etapa es más lenta por ocurrir en las zonas cristalinas donde la estructura altamente ordenada dificulta este proceso (89).

En los andamios porosos las características mismas de la superficie facilitan que se dé el ataque inicial a la zona amorfa lo que aumenta la porosidad y se comienza a fraccionar la estructura polimérica; simultáneamente se van dando otros procesos, hay una disminución del pH en la medida en que se rompen los enlaces de la cadena polimérica y las porciones más cristalinas son sometidas a actividad celular en un intento por degradarlas, pero también hay presencia de vasos sanguíneos y células

óseas, (90); Valencia, C.H; et al (2007) (83) encuentran que la formación ósea se presenta en forma simultánea con la resorción del PLLA; la Figura 128 muestra un defecto injertado con andamios porosos tipo C (PLLA-CHT), apreciándose una zona muy pequeña del injerto que aún no ha sido cubierto, el resto de la superficie no se diferencia del tejido normal; en el centro de los defectos se aprecian espacios donde el material está parcialmente resorbido.

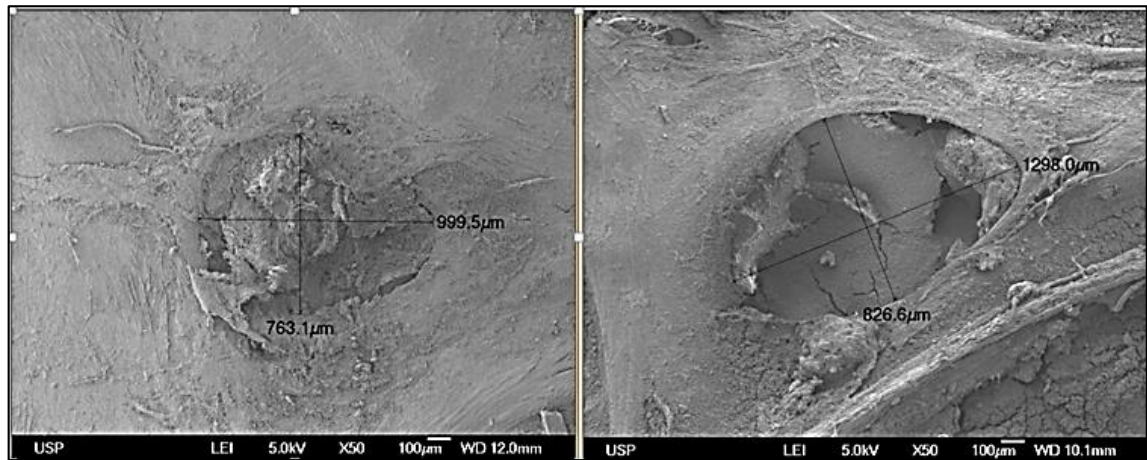


Figura 128. Andamio tipo C, implantado en hueso parietal de rata wistar. Técnica SEM.

La figura 129 muestra otro defecto con andamio tipo C, con características similares a los de la figura 126, pero se puede apreciar como el espacio dejado por el material resorbido está siendo ocupado por un grupo de células depositando producido celular.

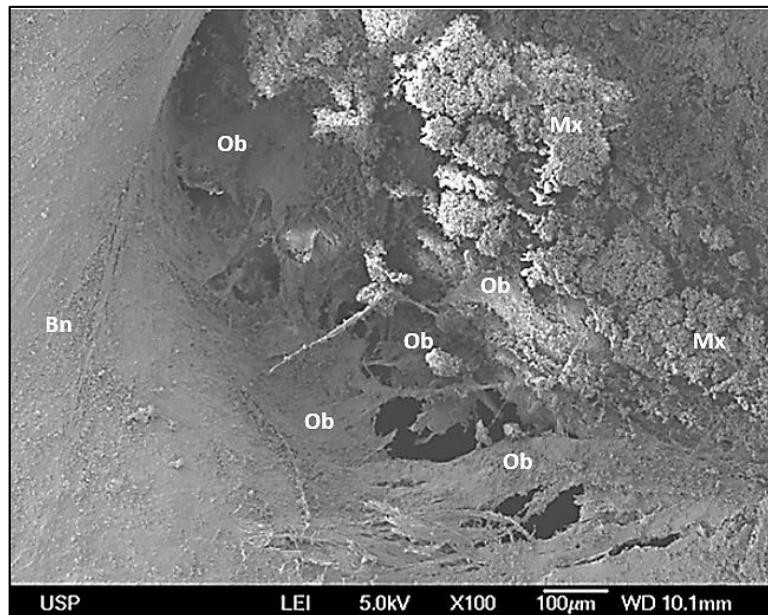


Figura 129. Andamio tipo C, implantado en hueso parietal de rata wistar. Técnica SEM. Bn: Hueso nuevo; Ob: Osteoblasto; Mx: Matriz extracelular o producido celular.

En contraste, en los andamios flexibles los osteoblastos utilizaron las fibras como matriz provisional y llenaron con su producido los espacios interfibrilares lo que permitió en algunos casos identificar el componente de PLLA en la muestra recuperada, (Fig. 130).

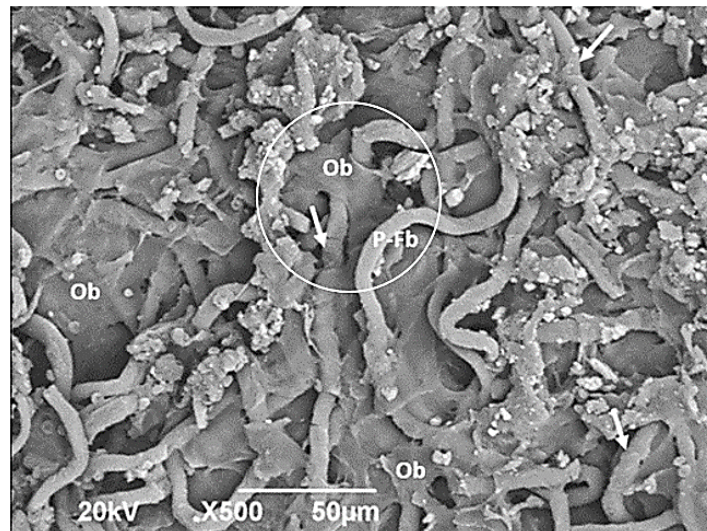


Figura 130. Andamio tipo D, implantado en hueso parietal de rata wistar. Técnica SEM. 500X. Ob: Osteoblasto; P-Fb: Fibras PLLA; Flechas: Fibras de PLA degradándose. El círculo muestra un osteoblasto sobre una fibra de PLLA.

Uno de los inconvenientes que se pueden presentar con el ácido poliláctico es que durante su degradación bajan los niveles de pH por acumulación de ácido láctico lo cual podría afectar su biocompatibilidad e inducir a una respuesta inflamatoria fuerte (91).

Según Stankevich, K; et al (2015) , (92) la citotoxicidad atribuida al aumento en la acides podría ocurrir solo si el organismo no fuera capaz de eliminar el exceso de ácido acumulado ocasionado por una degradación muy rápida del material; para Ramon , Y.; et al. (93) (2016) el organismo es capaz de neutralizar la caída del pH que puede llegar a 4,5 y las complicaciones reportadas en dispositivos ortopédicos implantados son escasas (menos del 10% de acuerdo a Stankevich, K; et al (2015)); adicionalmente la tasa de liberación del ácido láctico es dependiente de la velocidad de degradación del polímero ; según Solís, J; et al (94) (2009) la disminución del pH es menor cuando se utiliza un producto de mayor peso molecular, lo que se explica porque la estructura es químicamente más estable y por lo tanto la degradación es más lenta.

Para el caso de la presente investigación las variaciones de pH no parecen haber afectado la biocompatibilidad, de hecho las imágenes obtenidas con SEM muestran que los osteoblastos se han ubicado sobre las fibras de PLLA a pesar que estas están en franca degradación (Figs. 130 y 131, zonas del circulo) y a pesar de eso continúan produciendo matriz extracelular en forma abundante, con presencia de calcio, fosforo y nitrógeno como se aprecia en el análisis elemental (Fig. 131).

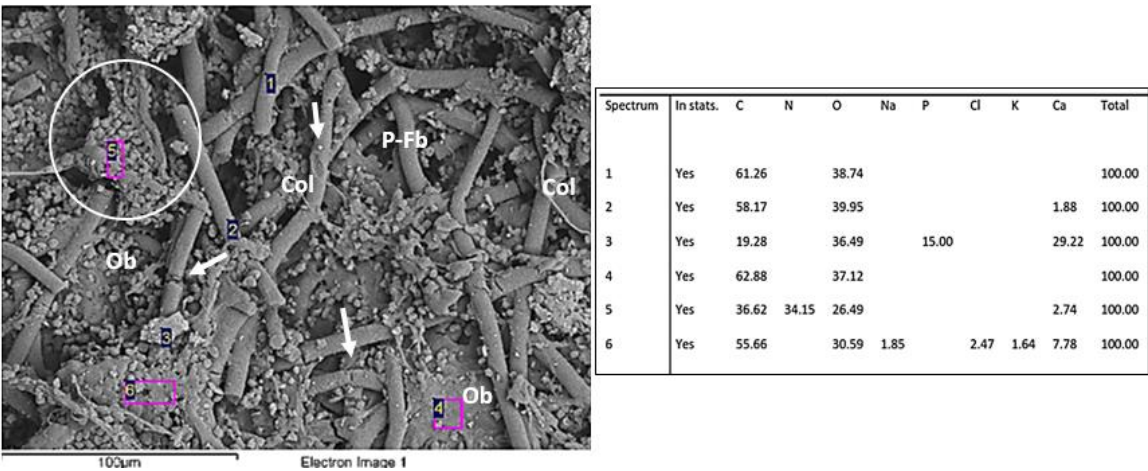


Figura 131. Andamio tipo D, implantado en hueso parietal de rata wistar. Ob: Osteoblasto; P-Fb: Fibras PLLA; Flechas: Fibras de PLA degradándose. El circulo muestra un osteoblasto sobre una fibra de PLLA con abundante producido celular con contenido de calcio. Técnica SEM/EDS. 500X.

Una vez completado el producido celular la red de fibras de PLLA quedan atrapadas e incorporadas a la matriz extracelular, identificándose además en la superficie elementos de la matriz como calcio, fósforo y nitrógeno, como se observa en la figura 132 y en el análisis elemental realizado.

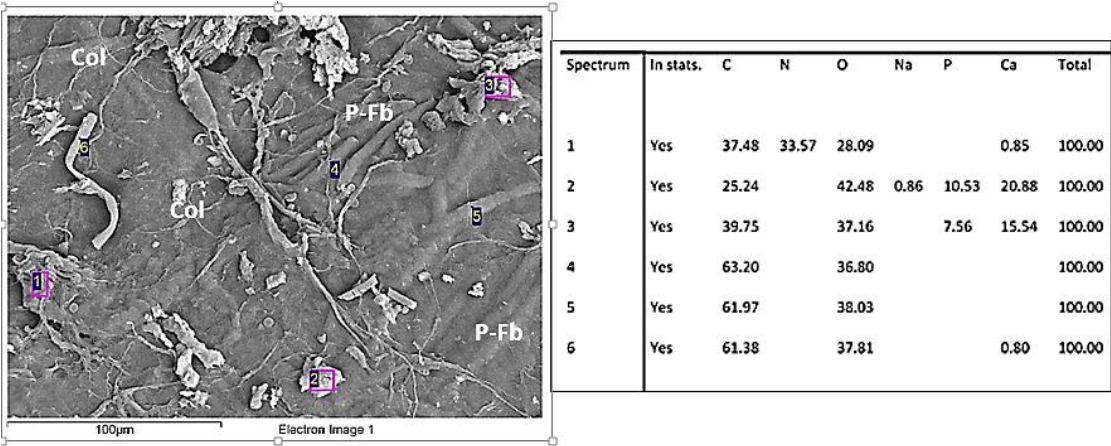


Figura 132 Andamio tipo D, implantado en hueso parietal de rata wistar. Col: Colágeno; P-Fb: Fibras PLLA. Técnica SEM. 500X.

Con relación a la segunda interrogante es claro que en los andamios rígidos los osteoblastos aprovechan los poros del andamio para anclarse y especialmente interesante que esto sea aprovechado para unir el andamio al hueso periférico en la zona de la interfaz, requisito necesario para la colonización misma de la estructura, lo cual se observa muy bien en las figuras 96 y 97.

Las imágenes obtenidas mostraron que una vez realizada la implantación y como consecuencia del proceso cicatrizal, la interfaz es ocupada por una pared de osteoblastos que producen matriz extracelular integrando el andamio al hueso periférico, (Fig. 133); integración realizada a expensas de fibras colágeno tipo III y I como se confirmó mediante las técnica tricrómicas (Gomori y Masson), asociadas a cristales de fosfato de calcio como se visualizó en los diferentes análisis EDS realizados.

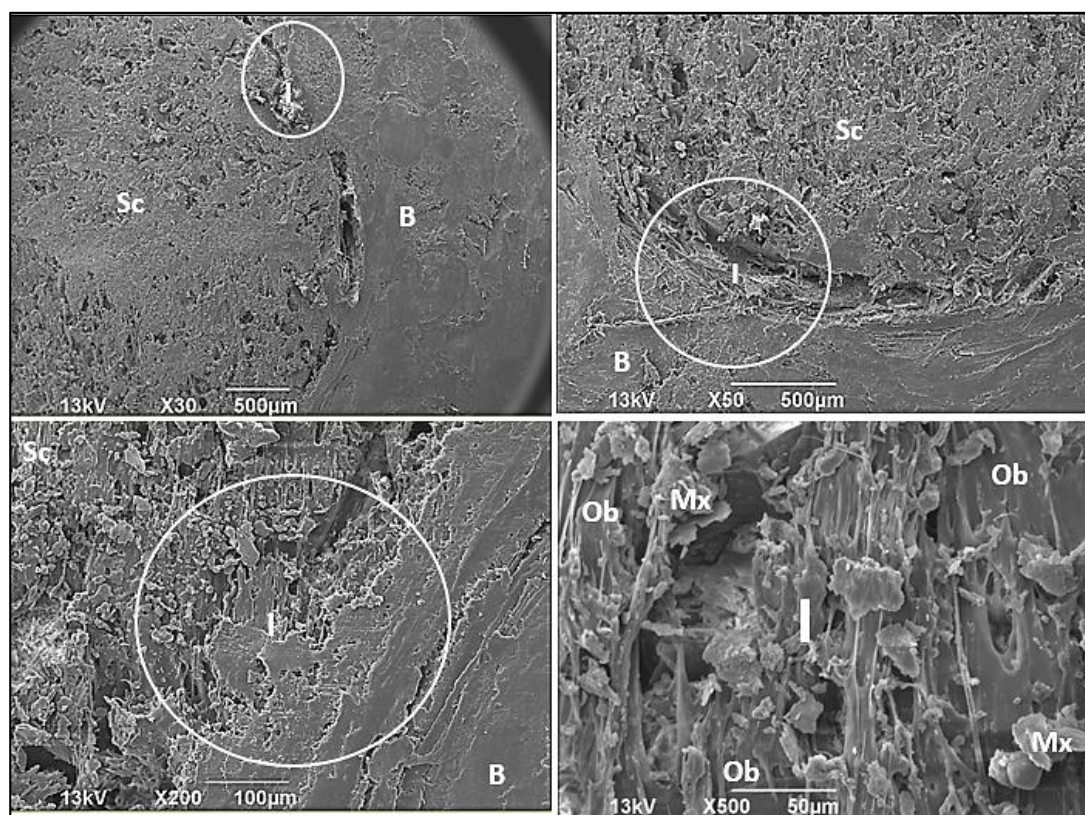


Figura 133. Andamio tipo C, implantado en hueso parietal de rata wistar. Col: Colágeno; P-Fb: Fibras PLLA. Técnica SEM. 500X

La espectroscopia realizada a la zona de la interfaz reveló presencia de calcio, nitrógeno y silicio, componentes normales de la matriz extracelular, (Fig. 134).

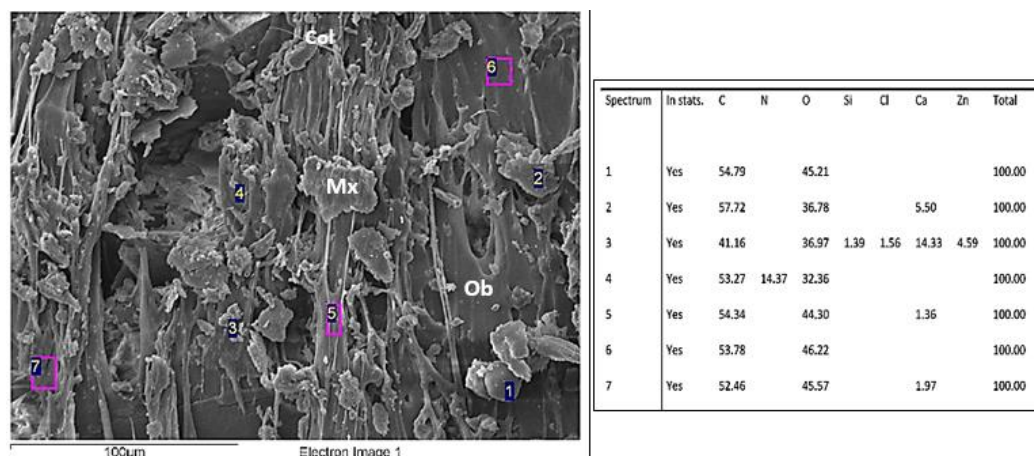


Figura 134. Andamio tipo C, implantado en hueso parietal de rata wistar. Técnica SEM/ EDS. 500X. Col: Colágeno; Ob: Osteoblastos; Mx: Matriz extracelular.

En el caso de los andamios flexibles, la biointegración fue similar a la descrita para los andamios rígidos, la figura 135 muestra a diferentes aumentos la zona de la interfaz para un andamio tipo D, apreciándose osteoblastos en la zona de la interfaz hueso andamio, (zona del círculo).

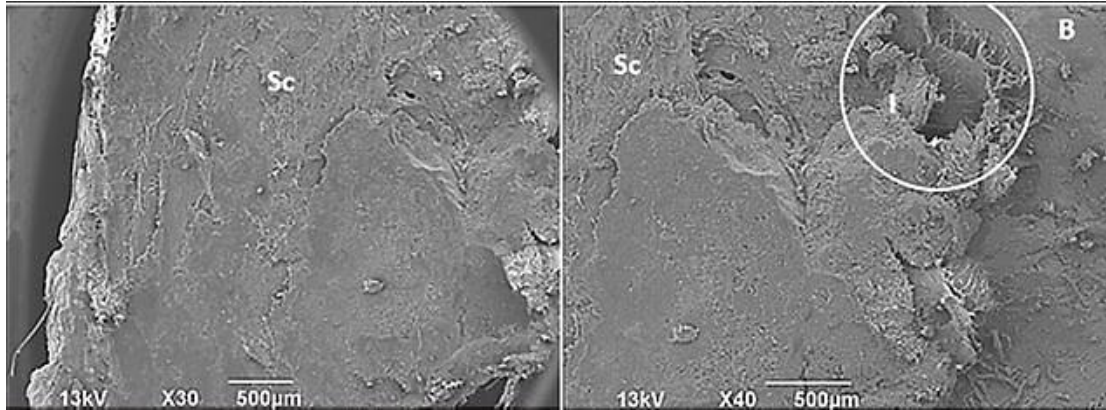


Figura 135. Zona de la interfaz en un andamio tipo D, implantado en hueso parietal de rata wistar. B: Hueso periférico; Sc: Andamio; I: Interfaz. Técnica SEM.

A mayor aumento (Figura 136) se observa como la pared de osteoblastos está uniendo el andamio al hueso periférico, mediante un proceso de biointegración por fibras colágenas; el círculo está indicando la zona de la interfaz hueso andamio que había sido señalada en la figura 135.

El andamio se observa en su superficie conformada por varias capas de osteoblastos (Ob1) inmersos en su matriz extracelular (Mx), en la zona del contacto íntimo con el hueso periférico hay una pared horizontal de osteoblastos que están uniendo el andamio (Sc) al hueso periférico (B) mediante una gran cantidad de estructuras fibrosas, que como se mostró anteriormente correspondieron a fibras colágeno tipo I y tipo III.

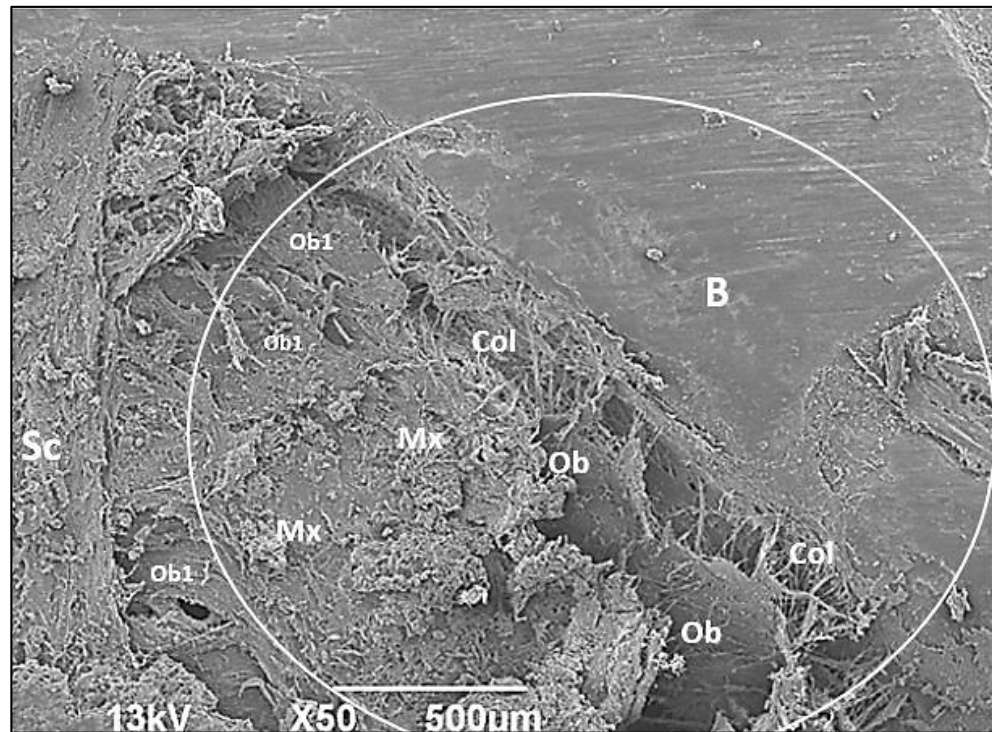


Figura 136. Interfaz hueso andamio tipo D. B: hueso remanente, Ob: Osteoblasto, Mx: Matriz extracelular; Sc: Andamio. Técnica SEM

Cuando se estudió la superficie del andamio a mayor magnificación fue posible apreciar una red de fibras poliméricas (PLLA) en proceso de degradación que estaban sirviendo de soporte a la capa de osteoblastos, también se observó presencia de fibras colágeno y abundante producido celular (Mx) con presencia de calcio y fósforo, (Fig. 137).

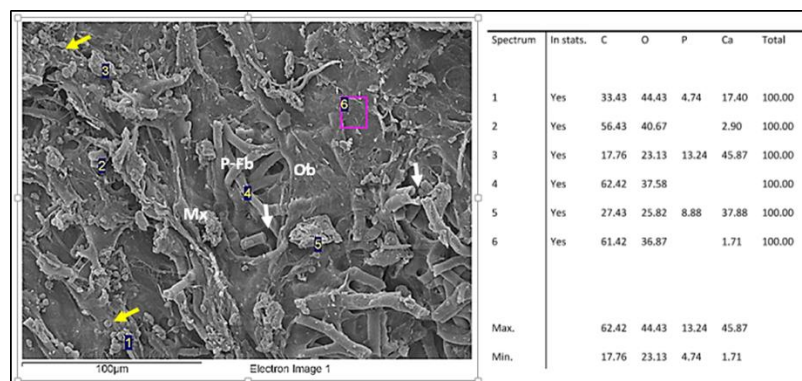


Figura 137. Zona de la interfaz en un andamio tipo D, implantado en hueso parietal de rata wistar. Técnica SEM a 500 X. ; Mx: Matriz extracelular; P-Fb: Fibras PLLA; Flecha blanca: Fibras de PLLA degradándose; Flecha amarilla: Vesículas de matriz.

Las figuras 138, 139 y 140 permiten una mayor aproximación al proceso de depósito y maduración de la matriz ósea extracelular en un andamio polimérico (en este caso uno tipo D).

La figura 138 muestra un andamio flexible elaborado en PLLA-CHT, su superficie se aprecia casi completamente cubierta por tejido óseo neo formado, la interfaz andamio hueso parece haber desaparecido, pero en la superficie se presentan zonas sin sellar en las cuales se observan gran cantidad de fibras.

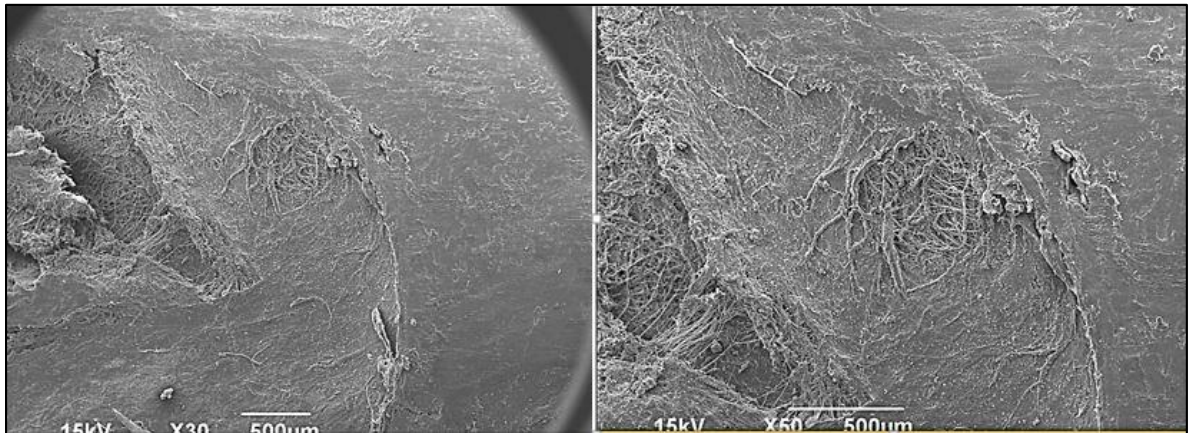


Figura 138. Andamio tipo D después de 3 meses de implantación en hueso parietal de rata wistar. Técnica EDS.

Cuando se analiza la estructura observada en la figura 138 a mayor aumento, se observa una gran cantidad de fibras tipo colágeno con abundante depósito de material en su superficie y sobre las mismas fibras, (figura 139).

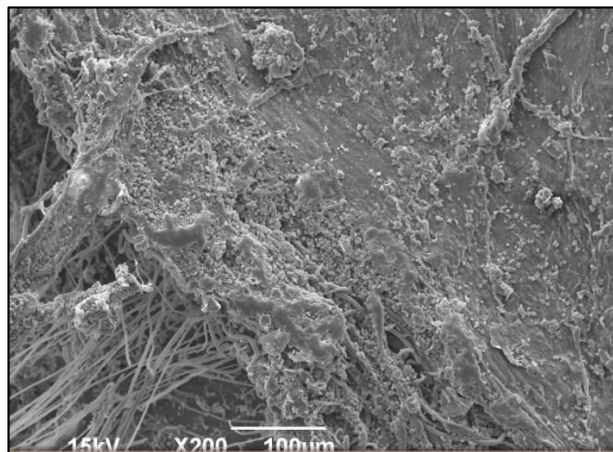


Figura 139. Andamio tipo D. zona de depósito de matriz extracelular. Técnica EDS

También es posible apreciar la presencia de gran cantidad de vesículas de matriz participando en el proceso de depósito y formación de la matriz extracelular y en contacto directo con las fibras colágeno, (figura 140).

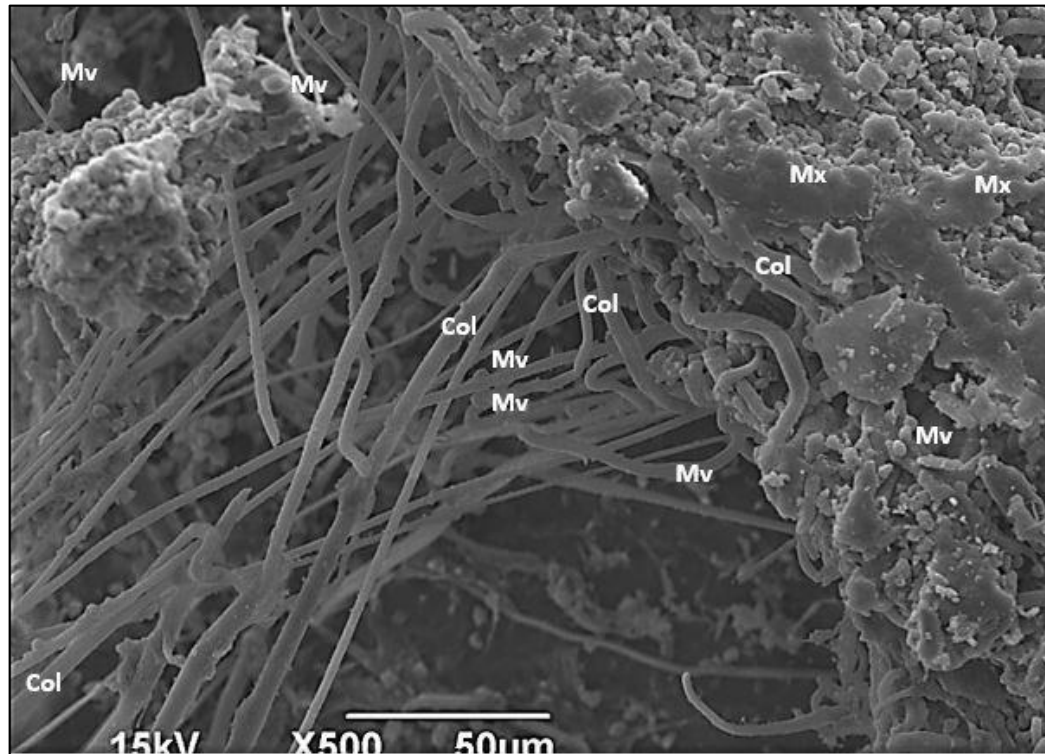


Figura 140. Andamio tipo D. Se observan vesículas de matrix (Mv) en contacto con fibras colágeno (Col) y depósitos de matriz extracelular (Mx). Técnica SEM.

Si se mira en forma integral los resultados de la investigación se observa que el proceso de cicatrización de los defectos injertados con andamios rígidos o flexibles se llevó a cabo en unos parámetros de “normalidad” en la medida en que la matriz de PLLA fue inicialmente integrada al hueso periférico mediante la participación de osteoblastos que sintetizaron fibras de colágeno III y tipo I; los osteoblastos colonizaron los andamios utilizando las irregularidades de las superficies y a las mismas fibras de PLA como soporte y produjeron matriz extracelular que llenó los poros, cubrió la superficie de los andamios, e incorporó a la estructura de fibras de PLLA a su matriz extracelular, para finalmente realizar la mineralización de la matriz. Simultáneamente al proceso de formación, maduración y mineralización de la matriz extracelular se presentaron efectos químicos y biológicos como la degradación y resorción del ácido poliláctico, además se evidenció la participación de vesículas de matriz tanto en la fase *in vitro* como *in vivo*.

En la medida en que se dio este proceso (degradación/resorción) permanecieron partículas del andamio y de las fibras de PLA que fueron rodeadas por una semicapsula y sometidas a la acción de un infiltrado de células mixtas, sin embargo esta respuesta inflamatoria fue transitoria y localizada a zonas específicas donde permanecían cristales del polímero sin degradarse o en proceso de degradación, una vez el material fue degradado desapareció el infiltrado inflamatorio y continuó la regeneración; lo cual está de acuerdo con la descripción del proceso reportado por Anderson, J.; & Shive, M. (2012) (95) quienes estudian la respuesta celular y tisular ante esferas de PLLA.

Ramon, Y.; et al. (2016) (93) reconocen la biocompatibilidad del PLA en aplicaciones médicas pero advierten que se debería estudiar más sus usos en el campo de la liberación de medicamentos (por posibles alteraciones químicas) o su utilización en tejidos como el nervioso donde los efectos producidos durante su degradación podrían no ser bien tolerados.

Para Ramon, Y.; et al. (2016) el proceso inflamatorio ante dispositivos de PLA implantados se da a través de una etapa aguda y una crónica; en la crónica los neutrófilos son remplazados por monocitos que posteriormente pueden diferenciarse a macrófagos que intentaran fagocitar al material presentándose el fenómeno de “ fagocitosis frustrada” en el cual el material es rodeado por una capsula fibrosa, a vascular y puede haber diferenciación a células gigantes; con el tiempo las células fagocitarias ayudaran a resorber el material y su número descenderá progresivamente.

Todo el proceso de biointegración, degradación /resorción y remplazo por tejido óseo estuvo acompañado de respuesta angiogénica lo cual es normal si se tiene en cuenta que la angiogénesis y la osteogénesis son procesos complementarios, de hecho la angiogénesis es considerado un prerrequisito para la osteogénesis (96) ; sin embargo la presencia de vasos de tamaño grande y aun el hallazgo de estructuras similares a osteonas se limitó a zonas donde se estaba dado el proceso de remplazo del polímero por tejido óseo, en aquellos sitios donde el tejido neo formado estaba maduro la apariencia histológica fue correspondiente con el hueso normal de la rata wistar en su hueso parietal,

3.5.3 Análisis histomorfométrico:

Para realizar el estudio histomorfométrico se dispuso de 5 muestras injertadas con andamios rígidos sin quitosano (B), 9 con andamios rígidos con quitosano (C), 6 con andamios con quitosano (D) y 6 con andamios flexibles sin quitosano (H).

Al comparar los dos tipos de muestras que fueron injertadas con andamios rígidos (B-C) se observa que la formación es mayor en las que originalmente contenían quitosano; al comparar las muestras que fueron injertadas con andamios flexibles se observa mayor formación ósea en los que originalmente tenían quitosano.

Para realizar el análisis estadístico con el fin de verificar si estas diferencias son significativas o no, se construyeron intervalos de confianza con un 95% de confianza con los siguientes resultados:

Tabla 4. Resultados estudio histomorfométrico (Promedios grupos)

Tipo de andamio	Proporción promedio	Tamaño de muestra	P(1-P)/n
B	0,396817272	5	0,047870665
C	0,745491882	10	0,018973374
D	0,662419599	9	0,024846653
H	0,574786472	6	0,040734497

Tabla 5. Comparación de grupos en análisis histomorfométrico

			Intervalo de confianza	
Comparación	Valor T-Student	Raíz	Lim inf.	Lim Sup
B-C	2,532637815	0,258542141	-1, 003468212	0,306118993
B-D	2,560032959	0,269661487	-0,955944622	0,424739967
B-H	2,685010847	0,297666193	-0,977206155	0,621267756
C-D	2,45805072	0,209332334	-0,431477313	0,597621778
C-H	2,509569411	0,244351941	-0,442512745	0,783923566
D-H	2,532637815	0,256088168	-0,560945451	0,736211706

Dado que todos los intervalos de confianza contruidos para la diferencia de proporciones contienen el valor cero, no hay evidencia suficiente para afirmar que el área osificada entre los diferentes tipos de andamio sea estadísticamente diferentes con un 95% de confianza.

Mediante esta prueba se determinó el porcentaje de tejido óseo neo formado y también el porcentaje de material polimérico degradado/resorbido, si se parte únicamente de la comparación de porcentajes se observa que la degradación /resorción y la aposición de tejido neo formado fue más lenta en los andamios flexibles, lo cual también fue evidente al revisar las imágenes obtenidas con las diferentes técnicas; no hay diferencias para el caso de los andamios flexibles, pero si entre los dos andamios rígidos siendo mejor los valores para los que tenían quitosano.

La no diferencia estadística al conformar los intervalos puede explicarse en que en la prueba se midió la neo formación sin importar el grado de maduración que tuviera,

lo cual es importante porque indicaría que todos los diferentes tipos de andamios que se cultivaron para obtener las matrices extracelulares sintéticas de alguna forma indujeran la cicatrización por regeneración de los defectos de tamaño crítico.

4. CONCLUSIONES:

Como resultado final de este trabajo se deducen varias conclusiones:

- 1) El diseño experimental de defecto de tamaño crítico fue exitoso al mostrar que los resultados son producto de la investigación misma.
- 2) Los andamios bioactivados con osteoblastos se comportaron como matrices extracelulares artificiales y facilitaron la regeneración de los defectos de tamaño crítico
- 3) En la fase experimental *in vitro* los andamios elaborados en PLA con quitosano lograron un mejor depósito de matriz extracelular
- 4) En la fase experimental *in vivo* todos los andamios lograron resultados cuantitativos similares, sin embargo se encontraron diferencias significativas en cuanto a la calidad de la cicatrización (presencia de fibras colágeno, depósito de matriz extracelular, persistencia de estructura polimérica, etc.).

5. PERSPECTIVA Y PROSPECTIVA

*El camino sigue y sigue
Desde la puerta.
El Camino ha ido muy lejos,
Y si es posible he de seguirlo
Recorriéndolo con pie fatigado
Hasta llegar a un camino más ancho
Donde se encuentran senderos y cursos.
¿Y de ahí adonde iré? No podría decirlo.*

(Poema atribuido a Bilbo Bolson "El Hobbit")

El Señor de los Anillos

J.R.R. Tolkien

En esta investigación se trabajaron dos perspectivas, la primera relacionada con los defectos de tamaño crítico y la segunda con la neoformación ósea cuando se emplean andamios poliméricos.

5.1. Descripción de la primera perspectiva:

Los defectos de tamaño crítico fueron inicialmente definidos por Schmitz y Hollinger (1986), como el tamaño de defecto intraóseo más pequeño que no puede regenerarse completamente durante toda la vida del animal, desde entonces este concepto fue adoptado por la comunidad científica como una herramienta metodológica que permitía evaluar biomateriales con la seguridad de que los resultados encontrados eran atribuibles a la investigación misma y no a la capacidad regenerativa del tejido óseo.

A partir de Schmitz y Hollinger el concepto ha evolucionado hasta la observación de Gossain (2002) que planteó que la no regeneración del defecto solo debería tomarse durante el periodo de realización del experimento.

La aceptación del concepto llevó a su aplicación en las ciencias biomédicas partiendo de la propuesta original que indicaba que el tamaño debería ser establecido para cada tipo de hueso y para cada especie particular, entendiéndose además que la cicatrización que se podría presentar sería de tipo fibroso con posibilidad de encontrar algún porcentaje de neoformación ósea.

El defecto de 5 milímetros realizado en hueso craneal de rata adulta, utilizado en este trabajo, es uno de los más empleados y es aceptado como válido.

En una amplia revisión realizada en el año 2014 por Vajgel et al, encontraron evidencia estadística para validar el tamaño de 5 milímetros pero no dispusieron de información suficiente para determinar el porcentaje de neoformación ya que en la literatura se reportan rangos que van del 2% al 35 % al primer mes, del 4% al 40,4% al segundo mes y del 9% al 45, 3% al tercer mes, casi todos determinados mediante técnicas histológicas.

Los resultados de esta investigación mostraron que el defecto de 5 milímetros en hueso craneal de rata wistar adulta realmente se comportó como crítico, al igual que en la mayoría de los trabajos reportados, que utilizan este tipo de diseño (control por defecto vacío).

Histológicamente se evidenció presencia de hueso neoformado pero en porcentajes insignificantes, en distribución como islas (una o dos) en la superficie meníngea del defecto; lo interesante es que al estudiar las muestras mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopia EDS se observó un tejido fibroso cubriendo el defecto con presencia de elementos constitutivos de la matriz ósea extracelular como fósforo y calcio. Sin embargo el defecto óseo como tal no mostró ninguna evidencia de regeneración.

Los resultados obtenidos con microscopía electrónica de barrido podrían estar indicando que lo reportado en la literatura como regeneración del defecto (en porcentajes bajos) estaría ocurriendo en el tejido fibroso cicatrizal y no en el defecto propiamente lo que abre un campo interesante de investigación en la caracterización de los tamaños críticos de defecto.

Este hallazgo de la “no regeneración” del defecto es muy importante ya que podría llegar a replantear todas las afirmaciones sobre regeneración de los “defectos críticos” determinados mediante métodos histológicos y aceptados actualmente por la comunidad científica.

Como prospectiva de esta parte de la investigación se recomienda realizar estudios adicionales comparando los resultados en defectos de tamaño crítico vacío mediante las dos técnicas pero utilizando métodos que no impliquen decalcificación del tejido.

5.2 Descripción de la segunda perspectiva

Los estudios clásicos sobre mineralización de la matriz ósea extracelular plantean que el osteoblasto deposita los diferentes componentes de la matriz, los cuales se

ensamblan mediante atracciones químicas permitiendo tener un andamiaje sobre el cual pueden proliferar nuevas células.

Las células liberarían componentes como fosfatasa alcalina la cual puede bloquear el pirofosfato para que así se evite una precipitación del calcio y del fósforo disponibles en el medio extracelular formándose cristales de fosfato de calcio, inicialmente en sitios específicos entre moléculas de tropocolágeno y posteriormente en las superficies de las fibras colágeno, actuando estas moléculas como atrayentes para los cristales de fosfato de calcio e iniciándose la formación de núcleos de cristalinización.

Desde hace algún tiempo se identificaron vesículas de matriz, estructuras redondeadas que utilizan los osteoblastos para transportar y liberar en el medio extracelular los componentes necesarios para ensamblar su propia matriz, algunas vesículas fueron caracterizadas encontrándose componentes orgánicos e inorgánicos, entre ellos calcio y fósforo, proponiéndose que serían estas vesículas las que iniciarían el proceso de nucleación del fosfato de calcio a partir del depósito controlado en los espacios entre las moléculas de tropocolágeno, sobre las fibras mismas y donde la célula lo necesita (con presencia o no de colágeno).

Diferentes autores como Anderson et al (2005), estudiando la osificación endocondral identificaron estructuras redondeadas que fueron caracterizadas como vesículas de matriz con contenido cristalino por su apariencia electrodensa en el microscopio electrónico de transmisión; adicionalmente Boonrungsiman et al. (2012) lograron identificar estas mismas estructuras en el interior de osteoblastos en cultivo; sin embargo son escasos los hallazgos de vesículas de matriz participando activamente en el proceso de mineralización en la osificación de tipo intramembranoso.

En el presente estudio mediante microscopía electrónica de transmisión se identificaron estructuras redondeadas electrodensas en posición intra y extracelular en osteoblastos cultivados en andamios rígidos y flexibles de ácido poliláctico, además mediante microscopía electrónica de barrido se visualizaron osteoblastos en proceso de liberación de vesículas y fue posible mostrar vesículas y micro vesículas en relación con fibras de quitosano, ácido poliláctico y colágeno.

En los análisis con microscopía electrónica de barrido de muestras implantadas también se hallaron vesículas participando en el proceso de formación y maduración de la matriz, algunas de ellas todavía unidas a porciones de membrana citoplasmática.

En general los análisis mostraron que las células se anclaron a poros del andamio o a fibras poliméricas para utilizarlas como matriz extracelular sintética que les permitieron proliferar y realizar el depósito de su matriz extracelular, algunas fibras todavía persistían, aunque en proceso de degradación; también se evidenció como la matriz extracelular creció en medio de las fibras, en los poros y sobre los andamios hasta terminar las estructuras sintéticas siendo incluidas en el tejido neo formado, mientras se dio el proceso de neoformación ósea.

El desarrollo de esta perspectiva permitió tener una mejor comprensión del proceso de degradación / resorción *in vivo* de estructuras de ácido poliláctico y se logró una aproximación al proceso de regeneración ósea en estructuras artificiales.

Como prospectiva se abren muchas posibilidades, por ejemplo faltaría determinar el contenido de las vesículas de matriz, no hay claridad sobre los mecanismos que utilizan las células para unirse al ácido poliláctico, se entiende que es a través de integrinas pero faltaría caracterizarlas, igualmente hace falta profundizar más en las relaciones matriz extracelular - quitosano y matriz extracelular - ácido poliláctico.

Referencias Bibliograficas

1. Mistry AS, Mikos AG. Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2005;94:1–22.
2. Marin, M; San Hipolito, L; Belarra, A; Martin, F; Martinez J. Injertos sustitutos no óseos . Aportaciones del ácido poliláctico y poliglicólico. *Av Periodon Implant*. 2009;1:45–52.
3. INMLyCF. Datos oficiales sobre la violencia en Colombia. Forensis [Internet]. 2014;16(1). Available from: <http://www.medicinalegal.gov.co/documents/88730/1656998/Forensis+Interactivo+2014.24-JULpdf.pdf/9085ad79-d2a9-4c0d-a17b-f845ab96534b>
4. Vallet-Regí M. Biocerámicas: evolución y aplicaciones. *Real Soc Española Química*. 2011;107(1):28–35.
5. Furth M E & Atala A. Future Perspectives (Tissue Engineering). In: Lanza & Langer & Vacanti, editor. *Principles of Tissue Engineering*. Four. Elsevier / Academic Press; 2007. p. 33–50.

6. Arvidson k, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenn, E, Gomez-Barrena E, Granchi D, Kasse, M, Konttinen YT, Mustafa K, Pioletti DP, Sillat T, Finne-Wistrand A. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2011;15(4):718–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129153>
7. Monaco E, Bionaz M, Hollister S J WMB. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;75(8):1381–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354606>
8. Nacamuli RP, Longaker MT. Craniofacial Bone Tissue Engineering. *Dent Clin N Am*. 2006;50:175–90.
9. Tobita M. Adipose-derived stem cells in dentistry. *J Oral Biosci* [Internet]. Elsevier; 2013;55(3):122–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2013.06.007>
10. Zhang Z, Teoh S H, Hu JHP, Fisk N.M, Choolani M CJK. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33(9):2656–72. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211014955>
11. Stockmann P, Park J, Von Wilmsky C, Nkenke E, Felszeghy E, Dehner JF., Tudor C SK. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells - A comparison of different tissue sources. *J Cranio-Maxillofacial Surg* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;40(4):310–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2011.05.004>
12. Liu J, Chen W, Zhao Z XH. Reprogramming of mesenchymal stem cells derived from iPSCs seeded on biofunctionalized calcium phosphate scaffold for bone engineering. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;34(32):7862–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.029>
13. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part I : Stem cell sources. *J Prosthodont Res* [Internet]. Japan Prosthodontic Society; 2012;56(3):151–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.06.001>
14. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I AK. Stem cells in dentistry – Part II : Clinical applications. *J Prosthodont Res* [Internet]. Japan Prosthodontic Society; 2012;56(4):229–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.10.001>
15. Unger R, Dohle E, Kirkpatrick J. Improving vascularization of engineered

- bone through the generation of pro-angiogenic effects in co-culture systems. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000472>
16. Ma P. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;60:184–98.
 17. Matsuno T, Omata K, Hashimoto Y. Alveolar bone tissue engineering using composite scaffolds for drug delivery. *Jpn Dent Sci Rev* [Internet]. Japanese Association for Dental Science; 2010;46(2):188–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2009.12.001>
 18. Huang S, Chen Z, Pugno N, Chen Q WW. A novel model for porous scaffold to match the mechanical anisotropy and the hierarchical structure of bone. *Mater Lett* [Internet]. Elsevier; 2014;122:315–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.02.057>
 19. Bose S, Roy M BA. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;30(10):546–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>
 20. Fukuda A, Takemoto M, Saito T, Fujibayashi S, Neo M, Pattanayak D, Matsushita T, Sasaki K, Nishida N, Kokubo T NT. Osteoinduction of porous Ti implants with a channel structure fabricated by selective laser melting. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2011;7(5):2327–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.01.037>
 21. Fielding G BS. SiO₂ and ZnO dopants in three-dimensionally printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis in vivo. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2013;9(11):9137–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.07.009>
 22. Billström GH, Blomb AW, Larsson S BAD. Application of scaffolds for bone regeneration strategies : Current trends and future directions. *Injury* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;44:S28–33. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1383\(13\)70007-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1383(13)70007-X)
 23. Fernandez T, Valencia C, Li Y, Thouas G, D N, Chen Q. Influence of Degrading Calcium Phosphate on the Remodelling and Mineralisation of Avascular Osseous Tissue in a Rat Calvaria Model. *Am J Biochem Biotechnol*. 2014;11(1):12.
 24. Raucci MG, D'Antó V, Guarino V, Sardella E, Zeppetelli S, Favia P AL. Biomineralized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. *Acta Biomater* [Internet]. Acta Materialia Inc.; 2010;6(10):4090–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.04.018>

25. Serra IR, Fradique R, Vallejo MCS, Correia TR, Miguel SP CI. Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;55:592–604. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493115301247>
26. Dorati R, Colonna C, Tomasi C, Genta I, Bruni G CB. Design of 3D scaffolds for tissue engineering testing a tough polylactide-based graft copolymer. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;34(1):130–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.08.037>
27. Balakrishnan H, Hassan A, Wahit MU, Yussuf AA, Razak SBA. Novel toughened polylactic acid nanocomposite: Mechanical, thermal and morphological properties. *Mater Des* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;31(7):3289–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2010.02.008>
28. Mano JF, Hungerford G, Gómez JL. Bioactive poly (L -lactic acid) -chitosan hybrid scaffolds. *Mater Sci Eng C*. 2008;XX.
29. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. REVIEW PAPER THREE-DIMENSIONAL SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING. 2001;85(1):1051–64.
30. Mourya VK, Inamdar NN. Reactive & Functional Polymers Chitosan-modifications and applications : Opportunities galore. *React Funct Polym*. 2008;68:1013–51.
31. Patrício T, Domingos M, Gloria A BP. Characterisation of PCL and PCL/PLA scaffolds for tissue engineering. *Procedia CIRP* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;5:110–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procir.2013.01.022>
32. Wade R; Burdick J. Advances in nanofibrous scaffolds for biomedical applications: From electrospinning to self-assembly. *Nano Today* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;9(6):722–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013214001364>
33. Boskey AL. Mineralization , Structure and Function of Bone. In: Seibel & Robins & Bilezikian, editor. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. New York: Elsevier / Academic Press; 2006. p. 201–2012.
34. Fattore A Del, Capannolo M, Rucci N. Bone and bone marrow: The same organ. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;503(1):28–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.07.020>
35. Fernández-Tresguerres, I , Alobera Gracia MA, Pingarrón M, Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(1):32–6.
36. Aubin JE, Heersche JNM. Bone Cell Biology Osteoblasts, Osteocytes, and

Osteoclasts. *Pediatr Bone Biol Dis*. 2003;43–75.

37. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*. 2012;45(12):863–73.
38. Jahani M, Genever PG, Patton RJ, Ahwal F, Fagan MJ. The effect of osteocyte apoptosis on signalling in the osteocyte and bone lining cell network: A computer simulation. *J Biomech* [Internet]. Elsevier; 2012;45(16):2876–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.08.005>
39. Franz-Odenaal T, Hall B, Witten PE. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006;235(1):176–90.
40. Buo AM, Stains JP. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS Lett* [Internet]. Federation of European Biochemical Societies; 2014;588(8):1315–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.025>
41. Torres Garcia- Denche J. Influencia del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea: Estudio densitométrico y morfométrico en calota de conejas osteoporóticas [Internet]. Universidad Rey Juan Carlos; 2006. Available from: <https://eciencia.urjc.es/bitstream/handle/10115/437/TESIS DOCTORAL 2006 urjc.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
42. Peng S, Liu XS, Huang S, Li Z, Pan H, Zhen W, et al. The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment : Involvement of osteoprotegerin. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;49(6):1290–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.08.031>
43. Vidal C, Roldan C. y flexibles bioactivos con quitosano obtenidos por la técnica de electrospinning y moldeo por fusión con posible aplicación en la regeneración de tejido óseo. CD Rom. Universidad del valle; 2015.
44. Fernández T, Olave G, Valencia CH, Arce S, Quinn JMW, Thouas G a, et al. Effects of calcium phosphate/chitosan composite on bone healing in rats: calcium phosphate induces osteon formation. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2014;20(13-14):1948–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460696>
45. Costantini M, Colosi C, Mozetic P, Jaroszewicz J, Tosato A, Rainer A, et al. Correlation between porous texture and cell seeding efficiency of gas foaming and micro fluidic foaming scaffolds. *Materials Sci Eng*. 2016;62:668–77.
46. Zhao Y, Tan K, Zhou Y, Ye Z, Tan WS. A combinatorial variation in surface chemistry and pore size of three-dimensional porous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds modulates the behaviors of mesenchymal stem cells. *Mater Sci*

Eng C [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;59:193–202. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.017>

47. Tang, W; Lin, D; Yu, Y et al. Bioinspired trimodal macro.pdf. *Acta Biomater.* 2016;32:309–23.
48. Bakker AD, Klein-Nulend J. Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones. In: Helfrich, Miep; Ralston S, editor. *Bone Research Protocols, Methods in Molecular Biology*. First. 2012. p. 19–30.
49. Gokhale, J; Boskey ARP. The Biochemistry of Bone. In: Marcus R, Feldman D KJ, editor. *Osteoporosis*. Second. New York: Academic Press; 2001. p. 107–88.
50. Simão AMS, Beloti MM, Cezarino RM, Rosa AL, Pizauro JM, Ciancaglini P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;146(4):679–87.
51. Pustiglioni FE, Antonio L, Alves P. CHARACTERIZATION OF BONE CELLS OBTAINED FROM THE CALVARIA OF NEONATAL RATS (OSTEO-1) AFTER SERIAL SUBCULTURE. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(5):442–7.
52. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;78:202–8. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813015002469>
53. Vicario C. El efecto osteoinductor de la matriz de los aloinjertos: Estudio experimental en cultivos de osteoblastos humanos [Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 2003. Available from:
<http://biblioteca.ucm.es/tesis/med/ucm-t26630.pdf>
54. Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S. Extracellular matrix protein mediated regulation of the osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Differentiation* [Internet]. Elsevier; 2012;84(2):185–92. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2012.05.001>
55. Golub EE, Boesze-battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop.* 2007;18:444–8.
56. Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2015;2015(2006):1–12.
57. Rodrigues WC, Fabris AL da S, Hassumi JS, Gonçalves A, Sonoda CK, Okamoto R. Kinetics of gene expression of alkaline phosphatase during healing of alveolar bone in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2016;xxx:1–5. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0266435616000784>

58. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Schinke T, Karsenty G. Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation and Function. *Princ Bone Biol* [Internet]. 2002;83–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120986521501074>
59. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;82:229–36. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1138/20110511>
60. Yamaguchi A, Sakamoto K, Minamizato T, Katsube K, Nakanishi S. Regulation of osteoblast differentiation mediated by BMP, Notch, and CCN3/NOV. *Jpn Dent Sci Rev* [Internet]. 2008;44(1):48–56. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1882761608000094>
61. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte : Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;561:3–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>
62. Mak KK, Bi Y, Wan C, Chuang PT, Clemens T, Young M, et al. Hedgehog Signaling in Mature Osteoblasts Regulates Bone Formation and Resorption by Controlling PTHrP and RANKL Expression. *Dev Cell*. 2008;14(5):674–88.
63. Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, et al. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: Comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 1999;75(1):22–35.
64. Rosa AL, Beloti MM. Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. *Braz Dent J*. 2005;16(3):225–30.
65. Kim I, Seo S, Moon H, Yoo M, Park I, Kim B, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Av*. 2008;26:1–21.
66. Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual Osteoblasts in the Developing Calvaria Express Different Gene Repertoires. *Bone*. 2001;28(4):351–61.
67. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-B and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 2012;8(2):272–88.
68. Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci*. 2005;10:822–37.
69. Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, et al. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation [Internet]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. p. 14170–5. Available from: <http://www.pnas.org/content/109/35/14170>

70. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys.* 2009;1790:1592–8.
71. Mahamid J, Sharir A, Gur D, Zelzer E, Addadi L, Weiner S. Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study. *J Struct Biol.* 2011;
72. Stenbeck G, Coxon FP. Role of vesicular trafficking in skeletal dynamics. *Curr Opin Pharmacol.* 2014;16:7–14.
73. Marques JM, Viegas C, Dias MI, Zagalo C, Gomes P, Fernandes MH, et al. Modified Model of Sub-Critical Size Cranial Defect in the Rabbit. *Int J Morphol* [Internet]. 2010;28(2):525–8. Available from: <Go to ISI>://WOS:000281373600031
74. Mariano R, Messori M, Morais A De. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma : a histologic and histometric study in the calvaria. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;109(1):72–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.08.003>
75. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):879–93.
76. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;(205):299–308.
77. Fernandez T, Valencia CH, Li Y, Thouas GA, Newgreen DF, Chen Q, et al. Influence of Degrading Calcium Phosphate on the Remodelling and Mineralisation of Avascular Osseous Tissue in a Rat Calvaria Model. *Am J Biochem Biotechnol.* 2015;11(1):25–36.
78. Issa JPM, Pitol DL, Iyomasa MM, Barbosa AP, Defino HLA, Volpon JB, et al. Collagen fibers evaluation after rhBMP-2 insertion in critical-sized defects. *Micron.* 2009;40(5-6):560–2.
79. Zanchetta P, Lagarde N, Uguen A, Marcorelles P. Mixture of hyaluronic acid, chondroitin 6 sulphate and dermatan sulphate used to completely regenerate bone in rat critical size defect model. *J Cranio-Maxillofacial Surg* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;40(8):783–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2012.02.011>
80. Ortolan XR, Fenner BP, Mezadri TJ, Tames DR, Corrêa R, De Campos Buzzi F. Osteogenic potential of a chalcone in a critical-size defect in rat calvaria bone. *J Cranio-Maxillofacial Surg* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;42(5):520–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2013.07.020>

81. Oliveira MR, Silva A deC, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. International Association of Oral and Maxillofacial Surgery; 2015;44(5):649–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2014.12.005>
82. Allais M, Maurette PE, Gomes de Moraes N, Barreto da Costa T, Fraga S, Dias de Oliveira e Silva E, et al. Comparative study of bone regeneration in critical cranial bone defects using bone marrow adult stem cells and calcium phosphate. *Rev Española Cirugía Oral y Maxilofac* [Internet]. SECOM; 2015;37(1):15–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130055813000671>
83. Valencia C., Pastrana E., Arroyave E., Morales C., Ramirez C, Gomez A, et al. “Determinación Del Tiempo De Reabsorción De Una Matriz De Ácido Poliláctico Utilizada Como Substituto Óseo En Cavidades Preparadas En Tibias De Conejo.” *Rev Odontos*. 2008;30:29.
84. Valencia C., Pastrana E., Arroyave E., Morales C., Ramirez C, Gomez A, et al. “Determinación Del Tiempo De Reabsorción De Una Matriz De Ácido Poliláctico Utilizada Como Substituto Óseo En Cavidades Preparadas En Tibias De Conejo.” *Rev Odontos*. 2008;31:29.
85. Volk SW, Shah SR, Cohen AJ, Wang Y, Brisson BK, Vogel LK, et al. Type III collagen regulates osteoblastogenesis and the quantity of trabecular bone. *Calcif Tissue Int*. 2014;94(6):621–31.
86. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Rossert J, de Crombrughe B. Type I Collagen. *Princ Bone Biol* [Internet]. 2002;189 – XVIII. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120986521501141>
87. Eyre DR, Weis MA. Bone collagen: New clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Int*. 2013;93(4):338–47.
88. Bustamante A, Osorio G, Sierra JS, Ramirez CM, Valencia C, Zuluaga H, et al. Descripción de los cambios histológicos producidos a los 60 días por una matriz de ácido poliláctico de alto peso molecular aglutinada con fosfato tricalcico injertada en cavaria de rata. *Rev Odontos* [Internet]. 2012;39:74–83. Available from: [http://www.unicieo.edu.co/revistaodontos/Odontos39/Descripcin De los cambios histolgicos proDuciDos a 60 Das por una matriz De ciDo.pdf](http://www.unicieo.edu.co/revistaodontos/Odontos39/Descripcin%20De%20los%20cambios%20histolgicos%20proDuciDos%20a%2060%20Das%20por%20una%20matriz%20De%20ciDo.pdf)
89. Solis Y, Betancourth C, Valencia C, Zuluaga H. Implantación de un relleno de ácido poliláctico para regeneración ósea. *Inf Técnico* [Internet]. 2009;73:6–15. Available from: http://biblioteca.sena.edu.co/exlibris/aleph/u21_1/alephe/www_f_spa/icon/45

896/Informador73/paginas/implantacion/pagina2.html

90. Valencia C. Descripción de cambios histológicos en respuesta a una matriz de ácido poliláctico implantada en tibias de conejo. *Rev Odontos*. 2008;30(3):4–6.
91. Wang X. Overview on Biocompatibilities of Implantable Biomaterials Xiaohong. In: Pignatello R, editor. *Advances in Biomaterials Science and Applications in Biomedicine*. 2013. p. 112–54.
92. Stankevich KS, Gudima A, Filimonov VD, Klüter H, Mamontova EM, Tverdokhlebov SI, et al. Surface modification of biomaterials based on high-molecular polylactic acid and their effect on inflammatory reactions of primary human monocyte-derived macrophages: Perspective for personalized therapy. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;51:117–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.047>
93. Ramot Y, Zada MH, Domb AJ, Nyska A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X16300989>
94. Di Toro R, Betti V, Spampinato S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymers. *Eur J Pharm Sci*. 2004;21(2-3):161–9.
95. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;64(SUPPL.):72–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.004>
96. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;561:109–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.006>

