

NOTA: Este archivo corresponde al documento enviado a la editorial para corrección de estilo y diagramación. Este archivo será remplazado tan pronto como el artículo diagramado esté listo. La información de publicación será entonces actualizada.

SECCIÓN: Ciencias Básicas, Biotecnología y Bioinformática

TITULILLO: Biocompatibilidad fosfato tricálcico y quitosano

Biocompatibilidad del fosfato tricálcico con quitosano para uso en regeneración ósea

Biocompatibility of tricalcium phosphate with chitosan for bone regeneration purposes

Biocompatibilidade do fosfato tricalcico com quitosano para uso na regeneração óssea

Edison Andrés Cruz Olivo

Odontólogo, Especialista en Periodoncia, Universidad del Valle, Cali, Colombia. Estudiante de Maestría en Odontología, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Shirley González Morales

Odontóloga, Especialista en Periodoncia, Universidad del Valle, Cali, Colombia. Práctica privada.

Carolina Moncada Quilindo

Odontóloga, Especialista en Periodoncia, Universidad del Valle, Cali, Colombia. Práctica privada.

Sandra Arce

Ingeniera Mecánica, Magistra en Ciencias, Docente Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Occidente, Cali, Colombia.

Carlos Humberto Valencia

Odontólogo, Especialista en Implantología, Fundación Universitaria CIEO (UniCIEO), Bogotá, Colombia. Candidato a doctor en Ciencias Biomédicas, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Olivo EA, González S, Moncada C, Arce S, Valencia CH. Biocompatibilidad del fosfato tricálcico con quitosano para uso en regeneración ósea. Univ Odontol. 2015 Ene-Jun; 34(73):__.

Recibido para publicación: 13/11/2014

Aceptado para publicación: 12/10/2015

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

RESUMEN

Antecedentes: Se busca desarrollar injertos óseos biocompatibles capaces de regenerar defectos óseos de tamaño crítico. **Objetivo:** Evaluar la biocompatibilidad in vivo del fosfato tricálcico con quitosano (FTQ) en piel, músculo y hueso. **Metodología:** Se asignaron 15 ratas Wistar a grupos A (piel), B (músculo), C, D y E (defectos óseos de tamaño crítico). Se implantó FTQ en cada tejido. Como control se colocaron esponjas de colágeno adyacente a los sitios evaluados. Las ratas de los grupos A y B se sacrificaron a los 20 días, mientras que las de los grupos C, D y E se sacrificaron a los 20, 40 y 80 días respectivamente. Para confirmar la biocompatibilidad del FTQ, se evaluó la respuesta inflamatoria en términos de porcentaje: ninguna (0 %), leve (<30 %), moderada (30-50 %) y alta (>50 %), después de 20, 40 y 80 días en el tejido óseo. **Resultados:** No se encontró ulceración ni supuración en piel, músculo o hueso. Después de 80 días, el FTQ se observaba incorporado a tejido fibrótico y oseointegrado al hueso nativo. **Conclusión:** El FTQ fue biocompatible in vivo en piel, músculo y hueso.

PALABRAS CLAVE

β -fosfato; biocompatibilidad; biomaterial; defecto óseo; hueso; quitosano; regeneración; tricálcico

ÁREAS TEMÁTICAS

Periodoncia; regeneración ósea

ABSTRACT

Background: It is necessary to develop bone grafts capable to regenerate critical size bone defects. **Objective:** To evaluate the biocompatibility in vivo of tricalcium phosphate with chitosan (TPC) in skin, muscle, and bone. **Methods:** 15 Wistar rats were assigned to groups A (skin), B (muscle), C, D, and E (bone). TPC was placed in each tissue. In groups C-E, critical size bone defect was grafted with TPC and collagen sponge was placed adjacent to test sites as a control. Animals from groups A and B were sacrificed after 20 days, while groups C-E at days 45, 60, and 80. Inflammatory response was evaluated in all tissues. To assess biocompatibility, the percentage of cells was evaluated as none (0 %), low (< 30 %), moderate (30- 50 %), and high (>50 %). **Results:** There were no signals of ulceration or suppuration in skin, muscle, and bone. After 80 days, TPC was incorporated into a fibrotic structure and osseointegrated to native bone. **Conclusion:** TPC was biocompatible with skin, muscle, and bone.

KEY WORDS

Alveolar bone loss; β -tricalcium phosphate; biocompatibility; biomaterial; bone; chitosan; regeneration

THEMATIC FIELDS

Bone regeneration; Periodontics

RESUMO

Antecedentes: É necessário desenvolver enxertos ósseos capazes de regenerar defeitos ósseos de tamanho crítico. **Objetivo:** Avaliar a biocompatibilidade in vivo do fosfato tricálcico com quitosano (FTQ) na pele, músculo e osso. **Métodos:** 15 ratos Wistar foram seleccionados nos grupos A (pele), B (músculo), C, D e E (defeitos osseos de tamanho crítico). FTQ foi implantado em cada tecido. Esponjas de colágeno foram implantadas como controle ao lado do defeito ósseo. Os biomodelos dos grupos A e B foram sacrificados em 20 dias; e aos 20, 40, 80 dias nos grupos C, D e E respectivamente. Para conferir a biocompatibilidade do FTQ a resposta inflamatória foi avaliada em termos de porcentagem: Nenhuma (0 %); leve (<30 %); moderada (30-50 %); alta (>50 %) depois de 20, 40 e 80 dias no tecido ósseo. **Resultados:** Não houve ulceração nem supuração na pele, musculo e osso. Após de 80 dias, FTQ foi incorporado em um tecido fibroso e foi osseointegrado no osso nativo. **Conclusão:** O FTQ foi biocompatível in vivo na pele, músculo e osso.

PALAVRAS CHAVE

B-fosfato tricálcico; biocompatibilidade; biomaterial; osso; perda de osso alveolar; quitosano, regeneração

ÁREA TEMÁTICA

Periodontia; Regeneração óssea

INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido conectivo altamente vascularizado e innervado compuesto por células y minerales de la matriz orgánica. Es capaz de regenerarse y remodelarse por medio de un proceso de reabsorción y aposición ósea. Además, es regulado por factores genéticos, nutricionales, mecánicos, vasculares, hormonales y locales, entre los cuales se encuentran los factores de crecimiento, citocinas y proteínas de matriz ósea. La reparación y regeneración de defectos de tamaño variable que resultan de traumas, tumores e infecciones, representan un reto para las cirugías ortopédica, reconstructiva periodontal y maxilofacial que usan trasplantes óseos (1-3).

Entre los injertos óseos, el hueso autólogo es el estándar de oro en cirugía reconstructiva debido a sus propiedades osteogénica, osteoconductiva y osteoinductiva. Sin embargo, presenta limitaciones como la disponibilidad de las cantidades adecuadas, la necesidad de dos sitios quirúrgicos (donante y receptor), lo cual aumenta la morbilidad para el paciente (3). Como alternativa al hueso autólogo se dispone del tejido óseo procesado que se origina de donantes humanos (vivos o muertos), a través de bancos de tejidos y órganos. Ellos ofrecen la posibilidad de disponer de cantidades mayores de tejido a costos razonables (2,4) así como de materiales procedentes de otras especies como bovinos, porcinos y corales (2).

Los materiales originados en otras especies (xenoinjertos) y los procedentes de donantes (homoinjertos) no están exentos de posibilidad de transmisión de enfermedades al paciente (5-7). Ello justificaría el desarrollo de materiales de origen sintético como una alternativa en regeneración ósea (8).

En diseños experimentales y en situaciones clínicas existe el defecto de tamaño crítico o volumen crítico. Este tipo de defecto es una preparación donde la pérdida de tejido óseo es tan grande que el tejido no tiene la capacidad de regenerarse por sí mismo en un período de 8 meses desde el momento en que se produce la lesión (9). La regeneración de defectos de tamaño crítico implica el uso de materiales bioactivos, como los sustitutos óseos tipo aloinjertos o xenoinjertos, que son productos bioinertes que al ser aplicados en estos tipos de defectos pueden generar un encapsulamiento fibroso. Se comportan solo como material de relleno, a diferencia de los materiales bioactivos que son capaces de generar una interfaz funcional con el hueso circundante (8).

El desarrollo tecnológico ha hecho posible el surgimiento de sustitutos óseos con propiedades de biocompatibilidad y osteoconducción y la posibilidad de ser bioactivados mediante técnicas de ingeniería tisular. Con ello se brindan cualidades de osteopromoción u osteoinducción (10,11). Por lo tanto, los biomateriales sintéticos para uso en regeneración ósea presentan ventajas como seguridad biológica, biocompatibilidad, disponibilidad ilimitada y bajo costo.

Dentro de los biomateriales sintéticos, el fosfato tricálcico han sido investigado y usado como sustituto óseo en formas densas y porosas en procedimientos de regeneración ósea (10,12,13). Debido a su composición química y su estructura porosa, el fosfato tricálcico es de fácil manipulación, es biocompatible y tiene propiedades de reabsorción y osteoconducción, lo que permite que ocurra cicatrización y remodelado óseo. De hecho, se ha encontrado neoformación activa de hueso alrededor y en íntimo contacto con el fosfato tricálcico, aún después de seis meses de su implantación en defectos óseos (14), así como una respuesta inflamatoria mínima (10). Adicionalmente, el fosfato tricálcico ha sido utilizado junto con el quitosano para mejorar la osteoconducción y quimiotaxis de las células osteogénicas para estimular la formación ósea (15).

El quitosano es un deacetilado derivado de la quitina, responsable de las interacciones electrostáticas con los aniones de glicosaminoglicanos, proteoglicanos (citocinas) y otras moléculas cargadas negativamente, lo que le permite retener y concentrar factores de crecimiento secretados por las células osteogénicas, ejercer un efecto quimiotáctico y aumentar la osteoconducción (16). Además, es un biomaterial reabsorbible, ya que se degrada mediante hidrólisis por acción de la lisosima y no provoca reacción de cuerpo extraño ni encapsulación fibrosa. Su cicatrización se da a través de un tejido de granulación asociado a una angiogénesis acelerada. Además, posee una propiedad antimicrobiana intrínseca, ya que interrumpe el transporte de compuestos orgánicos e inorgánicos a través de la pared celular bacteriana, lo que provoca la muerte de la bacteria y reduce la tasa de infección en la zona que se busca regenerar. Por esta razón, el quitosano ha sido utilizado junto con alginatos, hidroxapatita, ácido hialurónico, fosfato de calcio y factores de crecimiento, entre otros biomateriales, para uso en ortopedia (16,17).

El quitosano se añade al cemento de fosfato de calcio y se usa in vivo para el relleno de defectos óseos en huesos del cráneo, lo que ha permitido comprobar su biocompatibilidad, osteoconducción, reabsorción y remodelado. A su vez, se ha observado que, al añadir quitosano al cemento de fosfato de calcio, se crean macroporos y se obtiene un efecto de sinergia como material osteoconductor (16,17).

El objetivo de este estudio fue caracterizar y describir in vivo macroscópica e histológicamente, el comportamiento de una nueva formulación de un biocompuesto experimental del sistema β -fosfato tricálcico/quitosano al ser usado como injerto en piel, músculo y hueso bajo condiciones fisiológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio de diseño experimental fue aprobado por el comité de ética animal de la Universidad del Valle, en Cali, Colombia. Se utilizaron 15 ratas Wistar adultas, machos de tres meses de vida, cuyo peso promedio fue 350 g. Se distribuyeron en 5 grupos, para un total de 3 biomodelos por grupo como indica la norma ISO 10993-6 (18). En los dos primeros grupos (A y B), se implantaron dos muestras del material experimental y 2 muestras del control (esponjas de colágeno) a cada lado de la línea media corporal. La ubicación en el grupo A fue subdérmica y en el B fue intramuscular lumbar. Los grupos C, D y E fueron intervenidos para la preparación de defectos óseos bilaterales de 5 mm de diámetro y 0,8 mm de profundidad total en los huesos parietales. Por tratarse de un defecto de tamaño crítico, se realizó el modelo de control del tejido óseo por defecto vacío.

Protocolo de sedación de los biomodelos

La sedación de los biomodelos se realizó con una mezcla de barbitúricos: maleato de acepromacina, 6 mg/Kg vía intramuscular; xilacina al 2 %, 6 mg/ Kg vía intramuscular; ketamina 7 mg/Kg vía intramuscular. Los biomodelos se pesaron para aplicar las dosis necesarias de los medicamentos anestésicos y obtener el nivel de sedación deseado.

Protocolo de implantación del fosfato tricálcico con quitosano en piel y músculo

En el grupo A se realizó sedación, tricotomía y desinfección con solución de Isodine® en la región dorsal del biomodelo. Se hizo una incisión de 2 cm con mango de bisturí N.º 3 y hoja N.º 15 hasta llegar al tejido subcutáneo. Se crearon dos cavidades a lado y lado de la línea media dorsal por medio de pinzas romas. El fosfato tricálcico con quitosano se implantó en la cavidad del lado derecho y, como material de control, se implantó una esponja de colágeno en el lado izquierdo. La incisión se suturó con puntos simples en piel utilizando sutura absorbible 4,0 y se aplicó gentamicina tópica sobre la herida. Como cuidados postoperatorios se aplicaron clindamicina 600 mg intramuscular y tramadol 2 mg/Kg de peso y se suministró acetaminofén en gotas durante los 5 días siguientes.

En el grupo B se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente en piel para acceder al musculo glúteo derecho, donde se prepararon dos cavidades en el centro del musculo y en dirección paralela a las fibras musculares. Se implantó el fosfato tricálcico con quitosano en el glúteo derecho y el material de control en el glúteo izquierdo. La incisión se suturó con puntos

simples en piel con sutura absorbible 4,0 y se aplicó gentamicina tópica. Se realizó los mismos cuidados postoperatorios mencionados anteriormente.

Protocolo para implantación del fosfato tricálcico con quitosano para tejido óseo

Para los biomodelos de los grupos C, D y E se realizó tricotomía y desinfección en la región del cráneo con solución de Isodine ®. Sobre la línea media del cráneo, se realizó una incisión que se extendió desde la zona frontal hasta la occipital. Se elevó un colgajo mucoperióstico y se realizaron preparaciones circulares de 5 mm de diámetro por 0,8 mm de profundidad en la zona más posterior del hueso parietal. Estas se consideraron como defectos óseos de tamaño crítico. Se retiraron las tapas óseas hasta exponer la duramadre. Las preparaciones del lado derecho recibieron injertos de fosfato tricálcico con quitosano, mientras que las preparaciones control del lado izquierdo se dejaron vacías. Se confrontaron y suturaron los márgenes de la herida con sutura absorbible 4,0. Se realizaron los mismos cuidados postoperatorios mencionados anteriormente.

Protocolo para procesamiento de muestras y análisis histomorfométrico

Se sacrificaron los biomodelos de los grupos A y B a los 20 días y los biomodelos de los grupos C, D y E a los 20, 40 y 60 días, respectivamente. Para el procedimiento eutanásico se utilizó Eutanex® intraperitoneal previa sedación con barbitúricos. Las muestras se cortaron con micrótopo para obtener un grosor de 5 µm, se fijaron en formol amortiguado y se enviaron al laboratorio de histología de la Universidad del Valle en Cali, Colombia, para su análisis histomorfométrico.

En el análisis histomorfométrico, las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina, ácido periódico (tinción de PAS), alcian blue y tricrómica. Se determinaron los tipos celulares, así como la presencia de vasos sanguíneos y espículas óseas en cada grupo. La respuesta inflamatoria se evaluó por medio del recuento de células en términos de porcentaje: ninguna (0 %), baja (<30 %), moderada (30-50 %) y alta (>50 %), para determinar si existía el material era biocompatible o no.

RESULTADOS

Descripción macroscópica

El análisis macroscópico en piel mostró una cicatrización completa. Tanto el material experimental como el de control se observaban bien definidos, sin señales de ulceración ni exudado purulento (figura 1).

FIGURA 1

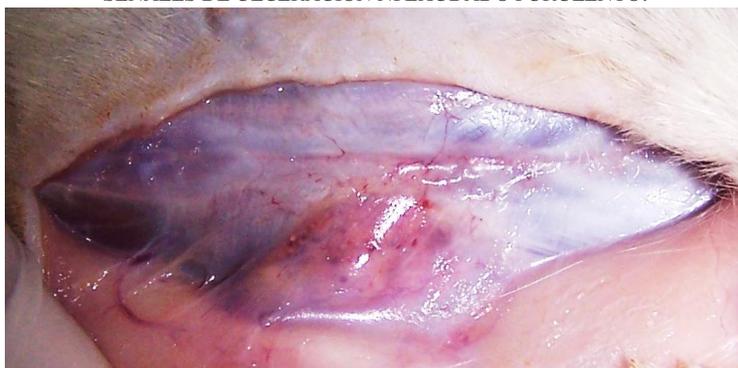
DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA EN PIEL. SE OBSERVA EL FOSFATO DE CALCIO CON QUITOSANO (A LA IZQUIERDA) Y CONTROL (A LA DERECHA) SIN SEÑALES DE ULCERACIÓN NI EXUDADO PURULENTO



Macroscópicamente, se encontró cicatrización completa el tejido muscular. Tanto los materiales experimentales como los de control estaban bien localizados. No se observaron signos de exudado inflamatorio ni purulento (figura 2).

FIGURA 2

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA EN MÚSCULO (GLÚTEO). SE OBSERVA EL FOSFATO DE CALCIO CON QUITOSANO SIN SEÑALES DE ULCERACIÓN NI EXUDADO PURULENTO.



Durante la descripción macroscópica del tejido óseo, se observó piel, periostio y tejido óseo alrededor de los sitios de injerto y control sin signos de exudado inflamatorio ni purulento. En el defecto vacío (control), se observó una capa delgada de tejido blando, mientras que en la cavidad injertada con el biomaterial experimental, había evidencia de biointegración (figura 3).

FIGURA 3

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA EN DEFECTOS ÓSEOS DE TAMAÑO CRÍTICO. NO HAY SEÑALES DE INFECCIÓN O EXUDADO PURULENTO. SE HALLÓ UNA CAPA DELGADA DE TEJIDO BLANDO RECUBRIENDO EL DEFECTO ÓSEO CONTROL, EN TANTO QUE EL BIOMATERIAL SE OBSERVABA BIOINTEGRADO EN EL DEFECTO ÓSEO DE TAMAÑO CRÍTICO

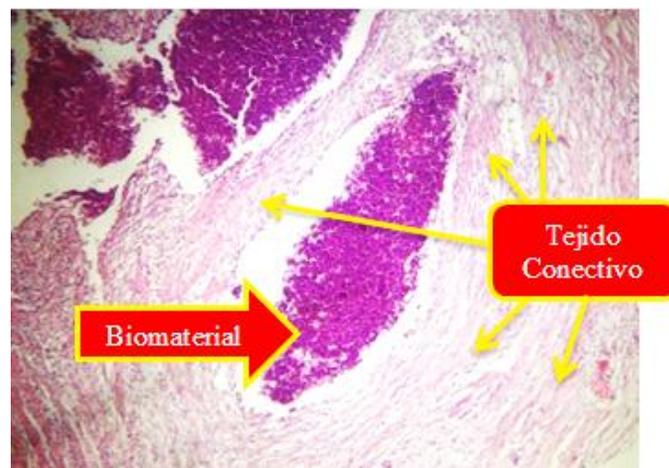


Descripción histológica del fosfato tricálcico con quitosano en piel, músculo y hueso

La descripción histológica en piel, mostró epidermis, dermis e hipodermis de aspecto normal con presencia de un cuerpo extraño amorfo. Este se hallaba en estado de disolución con infiltrado inflamatorio mixto constituido por células mononucleadas, granulocitos y polvillo granular. Alrededor del cuerpo extraño se observó tejido conectivo denso con moderada cantidad de vasos sanguíneos (figura 4).

FIGURA 4

DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA EN PIEL. SE APRECIA EN LA HIPODERMIS UN CUERPO EXTRAÑO AMORFO, EL CUAL SE OBSERVA EN ESTADO DE DISOLUCIÓN CON INFILTRADO INFLAMATORIO MIXTO, CONSTITUIDO POR CÉLULAS MONONUCLEADAS, GRANULOCITOS Y UN POLVO GRANULAR



En el tejido muscular, el biocompuesto experimental presentaba infiltrado inflamatorio constituido principalmente por linfocitos y macrófagos. A su vez, el material de control mostraba invasión por células gigantes multinucleadas. De hecho, ambos tejidos, tanto piel como músculo,

presentaba una cantidad de macrófagos entre moderada (30-50 %) y abundante (> 50 %) en los defectos críticos de control, en tanto que en los sitios que recibieron el injerto con el biocompuesto experimental, se observaba una cantidad abundante (>50 %) de linfocitos y baja (<30 %) de macrófagos, neutrófilos, granulocitos y fibroblastos, lo que representa una respuesta inflamatoria baja o incipiente (figura 5).

FIGURA 5

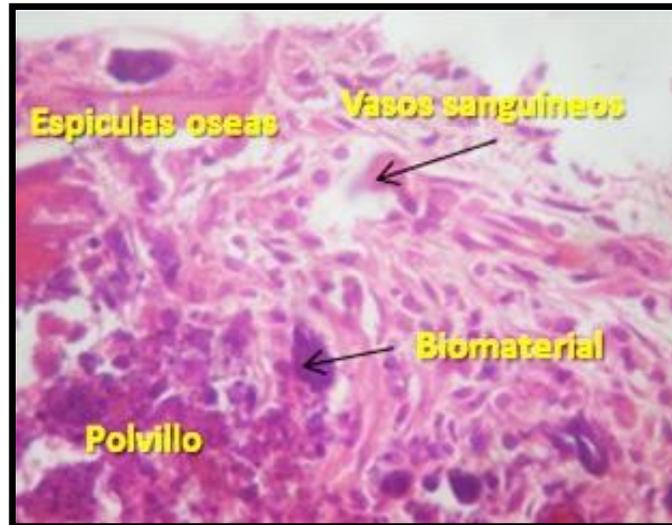
DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA EN MÚSCULO. TEJIDO MUSCULAR NORMAL, BIOMATERIAL (FOSFATO TRICÁLCICO CON QUITOSANO) CON UN INFILTRADO INFLAMATORIO CONSTITUIDO PRINCIPALMENTE POR LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS



Las imágenes histológicas en tejido óseo, 20 días después de sacrificar los animales, revelaron una cantidad moderada (30-50 %) de linfocitos y macrófagos, tanto en el sitio experimental como control. Ello indica una respuesta inflamatoria aguda, comúnmente observada en la fase inicial de cicatrización (figura 6). Después de 40 días del sacrificio de los biomodelos, se observó una cantidad de baja a moderada de linfocitos y macrófagos en los defectos injertados con el biocompuesto experimental. A su vez, se observó una cantidad moderada de vasos sanguíneos, lo cual indica la presencia de angiogénesis. En los defectos control, no se observó respuesta inflamatoria debido a la ausencia de células relevantes dentro del proceso de cicatrización.

FIGURA 6

DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA EN DEFECTO ÓSEO DE TAMAÑO CRÍTICO DESPUÉS DE 80 DÍAS. EVIDENCIA DE NEOFORMACIÓN ÓSEA (ESPÍCULAS ÓSEAS) Y VASOS SANGUÍNEOS EN EL BIOMATERIAL. ADICIONALMENTE, SE OBSERVA POLVILLO QUE MUESTRA LA BIODEGRADACIÓN DEL FOSFATO TRICÁLCICO CON QUITOSANO



Después de 60 días, en los defectos óseos de tamaño crítico que recibieron injerto del biomaterial se encontraron una cantidad baja (<30 %) a moderada (30-50 %) de linfocitos y macrófagos y abundante (>50 %) de fibroblastos, neutrófilos y vasos sanguíneos. Asimismo, había presencia de trabéculas y pocos osteoblastos, lo que indica presencia de osteogénesis alrededor de los sitios injertados con el biomaterial experimental. En los defectos del grupo control se encontró una cantidad baja (<30 %) de linfocitos y macrófagos.

DISCUSIÓN

El presente estudio fue diseñado para caracterizar y describir in vivo, macroscópica e histológicamente, el comportamiento del biocompuesto cerámico injertado en piel, músculo y hueso, bajo condiciones fisiológicas. El diseño de las pruebas se ciñó a la norma ISO 10993-6 (biocompatibilidad de los materiales y productos sanitarios dentales) (18) para la aplicación final del biomaterial en regeneración ósea. Al conocer la necesidad de tratar defectos óseos derivados de trauma, infecciones y tumores, así como las limitaciones que presentan autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, en términos de disponibilidad, morbilidad, seguridad biológica y costo-beneficio (5,19), este equipo investigó el comportamiento del fosfato tricálcico con quitosano in vivo en un modelo animal en diferentes momentos experimentales (20, 40 y 60 días) para determinar su biocompatibilidad como estimulación ósea para un potencial uso en regeneración ósea.

El biocompuesto experimental se obtuvo por la combinación del fosfato tricálcico con el quitosano, en una nueva formulación desarrollada en el laboratorio de la facultad de ingeniería de la Universidad Autónoma de Occidente en Cali, Colombia (20). Los dos materiales se seleccionaron con base en las propiedades de osteoconducción y bioactivación del fosfato tricálcico (21,22), su capacidad para mejorar la homeostasis y la cicatrización de la herida (15,23), junto con las propiedades sinérgicas del quitosano (16, 17). Se buscaba obtener una formulación innovadora de un biomaterial de fosfato tricálcico con quitosano capaz de regenerar

defectos óseos de tamaño crítico (5 mm de diámetro y 0,8 mm de profundidad), que fuera biocompatible, osteoconductor y osteoinductor, y garantizara la seguridad biológica para el paciente.

Las pruebas de biocompatibilidad realizadas *in vivo* mostraron que, tanto macroscópica como microscópicamente, el fosfato tricálcico con quitosano presentó una reacción inflamatoria asociada al proceso de cicatrización en los tres tejidos evaluados (piel, musculo y hueso). El tejido muscular mostró la mayor reacción inflamatoria en respuesta al biocompuesto, donde se identificó la presencia de linfocitos y macrófagos en forma abundante (>50 %). En el sitio control se observó una reacción inflamatoria mayor con presencia de células gigantes multinucleadas.

En el análisis histológico del tejido óseo se identificó una inflamación inicial ocasionada por el trauma quirúrgico, así como por la presencia del material experimental. Sin embargo, se observó una disminución en la intensidad de la respuesta inflamatoria y evidencia de reparación ósea después de 60 días con presencia de angiogénesis y osteogénesis que estaba caracterizada por la presencia de vasos sanguíneos y trabéculas óseas. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados encontrados en previos estudios (22).

Es importante resaltar que no se encontró tejido conectivo encapsulando el hueso neoformado. Por el contrario, las trabéculas óseas se observaron al lado de las partículas fosfato tricálcico con quitosano. Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos *in vitro* por Klokkevold y colaboradores en 1996 (23), quienes encontraron formación ósea a expensas de células osteoformadoras atraídas y unidas a las superficies del quitosano y a una aparente inhibición de los fibroblastos, lo que explicaría la poca producción de colágeno.

La limitación del presente estudio se asocia con el tamaño de la muestra. El presente estudio se basó en la norma ISO 10993-6 biocompatibilidad de los materiales y productos sanitarios dentales, ya que sugiere experimentar a partir de tres biomodelos como número mínimo para obtener resultados significativos. A su vez, de acuerdo con el comité de ética animal de la Universidad del Valle, se recomienda trabajar siguiendo el principio de las “tres R” formulado por Russel y Burch (1959) (24), el cual hace referencia a los tres requisitos básicos que debe cumplir toda experimentación con animales: (i) *Reducción*, que se refiere a la utilización del mínimo número de animales necesario para obtener un resultado fiable que permita alcanzar el objetivo buscado en la investigación; (ii) *Refinamiento*, que se entiende como la implementación de métodos para evitar o minimizar el dolor de los animales por medio de técnicas no invasivas; y (iii) *Reemplazo*, que hacen referencia a la implementación de estrategias que eviten o sustituyan el uso de animales por la utilización seres vivos invertebrados que carecen de sistema nervioso, tales como modelos celulares, microorganismos, plantas.

Por otro lado, a pesar de que tanto el fosfato tricálcico como el quitosano han sido reportados como biocompatibles, la biocompatibilidad y citotoxicidad del quitosano depende de su grado de desacetilización (25). El presente estudio permitió confirmar la biocompatibilidad del fosfato tricálcico con quitosano en piel, músculo y hueso después de 20 días de ser injertado. Adicionalmente, debido a que se encontró hueso neoformado, vasos sanguíneos y reabsorción

del biomaterial en defectos óseos de tamaño crítico después de 60 días, se podría explorar su potencial uso en procedimientos de regeneración ósea en humanos.

Los resultados acerca de la biocompatibilidad del material están de acuerdo con los resultados obtenidos previamente por Arce y colaboradores (20), quienes reportaron un relleno de defectos óseos de tamaño crítico en tibias de conejos, usando el fosfato tricálcico con quitosano como sustituto óseo. Adicionalmente, esta investigación muestra un sustituto óseo biocompatible con efecto potencial en la regeneración de tejidos óseos, especialmente en defectos de tamaño crítico.

CONCLUSIONES

El presente estudio confirmó la biocompatibilidad in vivo del fosfato tricálcico con quitosano en piel, músculo y hueso bajo condiciones fisiológicas, en un diseño basado en recomendaciones de la norma ISO 10993-6 (biocompatibilidad de los materiales y productos sanitarios dentales). Adicionalmente, se encontró el biocompuesto rodeado por hueso neoformado en defectos óseos de tamaño crítico después de 60 días, lo que indica una posible estimulación de la regeneración ósea. Por lo tanto, el fosfato tricálcico con quitosano podría ser una alternativa para su utilización como sustituto óseo en procedimientos de regeneración ósea al presentar ventajas como biocompatibilidad, seguridad biológica, osteoconducción, osteopromoción, adecuada disponibilidad (cantidad) y bajo costo para el paciente.

RECOMENDACIONES

A futuro se sugiere investigar la biocompatibilidad, efecto de osteoconducción y osteopromoción del fosfato tricálcico con quitosano en defectos óseos de volumen crítico en humanos. Adicionalmente, sería conveniente realizar investigaciones adicionales para entender el proceso osteogénico mediante pruebas avanzadas de inmunohistoquímica, que permitan caracterizar elementos de la matriz extracelular como material osteoide, fibras de colágeno y proteínas como el periostin.

REFERENCIAS

1. Mokbel N, Naaman N, Nohra J, Badawi N. Healing patterns of critical size bony defects in rats after grafting with bone substitutes soaked in recombinant human bone morphogenetic protein-2: histological and histometric evaluation. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2013; 51(6): 545-9.
2. Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontology* 2000. 1999; 19: 74-86.
3. Misch CM. Autogenous bone: is it still the gold standard? *Implant Dent.* 2010; 19(5): 361.
4. Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Caria PHF. Bone substitutes used in dentistry. *Int J Odontostomatol.* 2014; 8(2): 289-98.
5. Kim Y, Nowzari H, Rich SK. Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: a systematic review. *Clin Implant Dent Related Res.* 2013; 15(5): 645-53.
6. Sogal A, Tofe AJ. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol.* 1999; 70(9): 1053-63.

7. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. 2001; 22(12): 1599-606.
8. Lee K, Weir MD, Lippens E, Mehta M, Wang P, Duda GN, et al. Bone regeneration via novel macroporous CPC scaffolds in critical-sized cranial defects in rats. *Dent Mater*. 2014; 30(7): E199-E207.
9. Sculean A, Chapple ILC, Giannobile WV. Wound models for periodontal and bone regeneration: the role of biologic research. *Periodontology* 2000. 2015; 68(1): 7-20.
10. Yao CH, Liu BS, Hsu SH, Chen YS. Calvarial bone response to a tricalcium phosphate-gelatin crosslinked composite. *Biomaterials*. 2005; 26(16): 3065-74.
11. Schlichting K, Dahne M, Weiler A. Biodegradable composite implants. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2006; 14(3): 169-76.
12. Szabo G, Suba Z, Hrabak K, Barabas J, Nemeth Z. Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3-dimensional computed tomographic, histologic, and histomorphometric evaluations): preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16(5): 681-92.
13. Sato I, Akizuki T, Oda S, Tsuchioka H, Hayashi C, Takasaki AA, et al. Histological evaluation of alveolar ridge augmentation using injectable calcium phosphate bone cement in dogs. *J Oral Rehab*. 2009; 36(10): 762-9.
14. Kurashina K, Kurita H, Hirano M, Kotani A, Klein C, deGroot K. In vivo study of calcium phosphate cements: Implantation of an alpha-tricalcium phosphate dicalcium phosphate dibasic tetracalcium phosphate monoxide cement paste. *Biomaterials*. 1997; 18(7): 539-43.
15. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, et al. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol*. 2000; 71(3): 410-7.
16. Muzzarelli RAA. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*. 2011; 83(4): 1433-45.
17. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*. 2005; 26(30): 5983-90.
18. Larsson KS. Screening-tests for systemic effects of dental materials. *J Dent*. 1994; 22: S12-S5.
19. Putters TF, Schortinghuis J, Vissink A, Raghoobar GM. A prospective study on the morbidity resulting from calvarial bone harvesting for intraoral reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015; 44(4): 513-7.
20. Arce Guerrero S, Valencia Llano C, Garzón-Alvarado DA. Obtención de un biocompuesto constituido por fosfato tricálcico y quitosana para ser usado como sustituto óseo en un modelo animal. *Rev Cub Inv Biomed*. 2012; 31(3): 268-77.
21. Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaitre J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: An in vivo study. *J Biomed Mater Res*. 1996; 30(2): 193-200.
22. Fernandez T, Olave G, Valencia CH, Arce S, Quinn JMW, Thouas GA, et al. Effects of Calcium phosphate/chitosan composite on bone healing in rats: calcium phosphate induces osteon formation. *Tissue Engineering Part A*. 2014; 20(13-14): 1948-60.
23. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *J Periodontol*. 1996; 67(11): 1170-5.
24. Russel WMS, Burch RL. The principles of human experimental technique (1959). The global clearinghouse for information on alternatives to animal testing. Baltimore, MD: Johns

Hopkins University; 2014. Disponible en:
http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.
25. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. Int J Biol Macromol. 2013; 59: 46-58.

CORRESPONDENCIA

Edison Andrés Cruz Olivo
andrescruz.perio@gmail.com

Shirley González Morales
shirliodon02@hotmail.com

Carolina Moncada Quilindo
carito17377@hotmail.com

Sandra Arce
sarce@uao.edu.co

Carlos Humberto Valencia
carvalenc@gmail.com