

## **Artículo de Investigación**

### **MEMBRANAS TRIDIMENSIONALES DE HIDORXIAPATITA Y QUITOSANO COMO TERAPÉUTICA EN REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA. ESTUDIO DE CASO**

Gladys Velazco<sup>1</sup>, Anajulia González<sup>1</sup>, Reynaldo Ortiz<sup>2</sup>, Jenair Yépez<sup>1</sup>

1. Centro de Investigaciones Odontológicas. Laboratorio Integrado de Biología Molecular Celular. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
2. Departamento de Química. Laboratorio de Electroquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

**Autora de correspondencia:** Gladys Velazco. E-mail: [gvelazco@ula.ve](mailto:gvelazco@ula.ve)

**Recibido: 23-11-2013; aceptado: 12-02-2014**

#### **RESUMEN**

La regeneración ósea guiada (ROG) es un procedimiento para recuperar hueso alveolar atrofiado o perdido, mediante la utilización de barreras (membranas), siendo ideales en estos procedimientos, creando un espacio entre la pérdida ósea y el colgajo, permitiendo la migración y proliferación de células estabilizando el nuevo coágulo formado. Objetivo: Diseñar membranas tridimensionales a base de materiales biocompatibles quitosano e hidroxiapatita para ser utilizadas en la regeneración ósea guiada. Metodología: Masculino de 42 años de edad, con diagnóstico de quiste periapical en el 22. Se realizó una membrana combinada con quitosano e hidroxiapatita nanométrica según metodología de Velazco y col 2011. Resultados: Se realizó MEB y EDX a las membranas. El EDX demostró la presencia de O, C, P y Ca en proporciones más bajas Al en trazas Cl y Na, manteniendo su identidad físico-química. La MEB indicó fase apatítica obtenida sobre la superficie del quitosano, en forma de agregados globulares y grupos pequeños de cristales. La hidroxiapatita junto con el quitosano demostró variabilidad geométrica y estabilidad estequiométrica. Se realizó apicetptomia del 22 y colocación de la barrera, primer registro radiográfico al mes se observa una disminución de la circunferencia del defecto, aumento de la radio opacidad característica del tejido y a los tres meses, ya la regeneración ósea se hace evidente observándose islotes óseos típicos de proliferación celular. Conclusión: El desarrollo andamiajes tridimensionales a base de hidroxiapatita y quitosano demuestran la adecuada proliferación celular, vislumbrándose como la respuesta a una más rápida eficiente mineralización del tejido óseo dañado.

**Palabras Clave:** Quitosano, Hidroxapatita, Regeneración ósea.

#### **MEMBRANES BASED HIDORXIAPATITA DIMENSIONAL AND THERAPEUTIC CHITOSAN BASE AS GUIDED BONE REGENERATION**

##### **Abstract**

Guided bone regeneration (GBR) is a procedure for recovering lost or atrophied alveolar bone through the use of barriers (membranes) which are suitable in those processes by creating a space between bone loss and the flap allowing the migration and proliferation of cells, stabilizing the new clot formed. Objective: To design dimensional membranes based on biocompatible materials chitosan and hydroxyapatite to be used in bone regeneration. Methodology : A 42 years old male diagnosed with periapical cyst in 22. A membrane combined with chitosan and nanometric hydroxyapatite was made by following Velazco et al's methodology. Results: SEM and EDX was performed to membranes. The EDX showed the presence of O, C, P and Ca, in lower proportions Al in Na Cl traces maintaining its physical and chemical identity. SEM indicated the apatite phase obtained chitosan's surface, in the shape of globular aggregates and small groups of crystals. PAH with chitosan showed variability geometric and stoichiometric stability. Apicetptomy and barrier placement was performed in 22. A month later, the first radiographic record showed a decrease of the defects of the circumference, an increase of the characteristic tissue's radiopacity tissue feature; three months after the procedure bone regeneration was evident and bone islands typical for cell proliferation were observed. Conclusion: The development of three-dimensional HAP and Chitosan based scaffolds demonstrate an adequate cellular proliferation seen as the response to a faster damaged bone tissue mineralization.

**Key Words:** Chitosan, Hydroxyapatite, Guided bone regeneration

## INTRODUCCIÓN

Durante décadas los tratamientos para patologías y alteraciones en los tejidos de soporte han sido un tema de profunda investigación. La reconstrucción ósea es un requisito fundamental para la rehabilitación funcional de los maxilares. La regeneración ósea guiada (ROG) es el nombre con el cual se denomina a aquellas cirugías que se efectúan con la intención de recuperar hueso alveolar atrofiado manteniendo el ya existente en brechas edéntulas, mediante la utilización de barreras (membranas) <sup>(1)</sup>. Para realizar ROG es necesario contar con materiales que cumplan con los siguientes requisitos 1. Biocompatibilidad; 2. Oclusividad celular; 3. Generación de espacio; 4. Integración a los tejidos y 5. Fácil manipulación, además, es necesario que permanezcan el tiempo suficiente como para permitir la proliferación celular <sup>1,2</sup>. El hueso autólogo es considerado el patrón de oro; sin embargo, presenta inconvenientes muy importantes, como la morbilidad de la zona donante y la limitación en la cantidad de hueso disponible. Para superar esos inconvenientes se busca incansablemente el sustituto óseo ideal. Los principios de la ROG postulan que los biomateriales en forma de membrana crean un espacio o barrera entre la pérdida ósea y el colgajo permitiendo la migración y proliferación de células óseas que puedan reparar el defecto óseo protegiendo y estabilizando el nuevo coágulo formado de los movimientos mecánicos que lo puedan desintegrar, evitando de igual manera la invaginación del tejido blando dentro del defecto <sup>2,3</sup>, estas barreras se utilizan también para ganar hueso alveolar de manera vertical, tratar defectos intraóseos, cubrir la pérdida de

hueso vestibular cuando se realiza un levantamiento de membrana sinusal y en casos de pérdidas óseas pre y post cirugía de colocación de implantes <sup>2</sup>. El material más utilizado para la confección de barreras no reabsorbibles ha sido el politetrafluoroetileno expandido, los resultados satisfactorios han sido una característica común e incuestionable de la innumerable cantidad de trabajos de experimentación y casos clínicos publicados al respecto, no obstante, algunos autores sugieren la utilización de membranas reabsorbibles, argumentando la obtención de resultados igualmente predecibles sin requerir segundas cirugías de remoción <sup>4</sup>. Otro de los materiales utilizados con mucho éxito en la fabricación de membranas es el colágeno, existen estudios en los que se ha demostrado que las membranas de colágeno son efectivas para evitar la invasión de tejido fibroso en técnicas de ROG; sin embargo, ante determinadas situaciones clínicas, estas membranas no resisten la presión que le ejercen los tejidos durante la cicatrización, induciendo al colapso de la herida con el subsiguiente fracaso de la técnica, por esta razón que se aconseja su utilización en combinación con distintos tipos de injertos, con la intención de mantener dicho espacio <sup>4</sup>.

El Quitosano ha ganado un merecido lugar en la terapia de regeneración ósea gracias a sus características y propiedades, despertando el interés de los investigadores en estudiar sus aplicaciones <sup>5,6,7,8</sup>, considerando que Quitosano (Q) ha demostrado propiedades regenerativas en diversos tejidos; siendo un producto de origen animal relativamente fácil de obtener y posiblemente también de menor costo que los

materiales usados tradicionalmente, ya que por sus características de biocompatibilidad y factibilidad biológica es usado en medicina como estimulante en la cicatrización de lesiones extensas, presentando muy escasos efectos adversos se ha aplicado en la regeneración de defectos óseos en odontología.<sup>9</sup> Se ha demostrado su aplicación como material de sustitución ósea, en forma de membrana en periodoncia, la membrana de quitosano ha confirmado su biocompatibilidad pues incrementa la regeneración ósea y no se observan reacciones inflamatorias adversas.<sup>10</sup> Entre las técnicas de preparación de los compuestos el método de mezclado de hidroxiapatita (HAP) con quitosano, es de los más empleados para obtener matrices tridimensionales en la ingeniería de tejidos.<sup>11</sup> Las proyecciones clínicas de la aplicación de Quitosano en procesos regenerativos parece ser muy promisorio, el presente trabajo reporta el diseño de una terapéutica nueva desde el diseño hasta la aplicación clínica pretendiendo dar una visión actualizada del material y sus aplicaciones clínicas.

## MATERIALES Y METODOS

**Presentación del Caso:** Paciente masculino de 42 años de edad, quien acude a la consulta por presentar episodios repetidos de enrojecimiento mucoso y aparición de punto fistuloso en repetidas oportunidades en la zona antero superior de la premaxila. Al examen radiográfico, se observa amplia zona radiolúcida en el ápice del 22 (cabeza de flecha), diagnosticándose un quiste periapical, como se observa en la figura 1.



**Figura 1. Radiografía periapical inicial.**

Se realizó prueba de vitalidad pulpar de 21 y 23 decidiéndose realizar endodoncias posteriores en ambas piezas. Para la rehabilitación de este defecto óseo se efectuó un procedimiento de eliminación quirúrgica del quiste, apiceptomia obturación a retro y colocación de una membrana combinada de HAP/Q como barrera, preparada en el laboratorio de Biología Celular y Molecular (LIBCEM) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes, Mérida Venezuela. Para la preparación de la membrana se siguió la metodología aplicada por Velazco y colaboradores<sup>12</sup>.

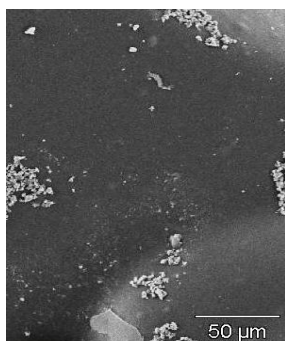
**Preparación de la solución de quitosano:** Se preparó una solución de quitosano pesando 5 gr quitosano, Quitosan®, GUINAMA certificado para uso médico, colocándolo en una solución acida constituida por 2 ml de ácido acético al 99% y agua en c.s.p. para 250 ml, se dejó en agitación constante por 12 horas obteniendo un gel de quitosano ácido. El volumen total de la solución de quitosano fue doblemente filtrada para eliminar las impurezas y microorganismos que pudieran contaminar la solución. La primera filtración se realizó con papel Whatman nº 1, para eliminar las impurezas residuales y el

segundo filtrado con filtro de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  para garantizar la eliminación total de bacterias e impurezas. Una vez filtrado, la solución de quitosano se mezcló con 0.2 g de HAP nanométrica, el procedimiento consiste en mezclar el polvo cerámico previamente preparado con una disolución de quitosano logrando una suspensión lo más homogénea posible que con mezclado constante se dispersó en toda la solución y se dispensó 20ml en placas de Petri, incubándose en una estufa de calor seco a 40° C durante 16 horas con la finalidad de evaporar completamente la fase líquida, obteniendo la deshidratación del compuesto, en una fina película. Las películas de Q+HAP fueron neutralizadas con NaOH 0.5% hasta su desprendimiento de la placa de Petri y posteriormente lavadas abundantemente con agua destilada a fin de eliminar los restos del NaOH 0.5%. La película neutralizada fue colocada en un envase para darle forma y se incubó por 2 horas a 50° C, para su secado. Posteriormente fueron recortadas y esterilizadas en cámara de ultravioleta por 15 minutos y luego selladas en empaques de fabricación propia lista para su uso.

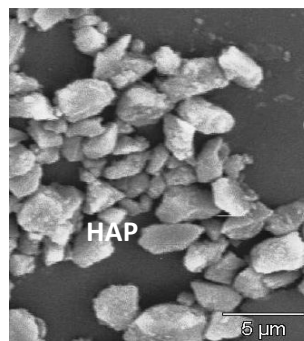
**Preparación de las muestras para Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y analizador de energía dispersiva de rayos X (EDX):** Para su análisis en el microscopio electrónico de barrido (SEM-EDX), las películas fueron recortadas obteniéndose cuadros de 1 x 1 cm de área, estas se cubrieron con una capa de oro por aproximadamente 15 min, metalizado indispensable, porque además de hacer conductiva la superficie, elimina la electricidad estática, minimiza el daño por radiación y aumenta la reflectividad electrónica.

## RESULTADOS

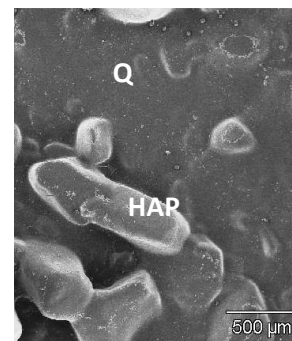
La morfología final de los compuestos es una propiedad importante que influye sobre la funcionalidad de estos materiales, debido a que sobre ella es donde se realizan las condiciones de reacción, tales como: la concentración, la temperatura, el pH, la conformación, el tiempo y la interacción relleno-matriz para promover la aposición celular. La figura 2a muestra la morfología final del compuesto Q\HAP a 100 X, observándose la fase apatítica obtenida sobre la superficie del quitosano, en forma de agregados



**Figura 2a. Muestra la morfología final del compuesto Q\HAP a 100 X**



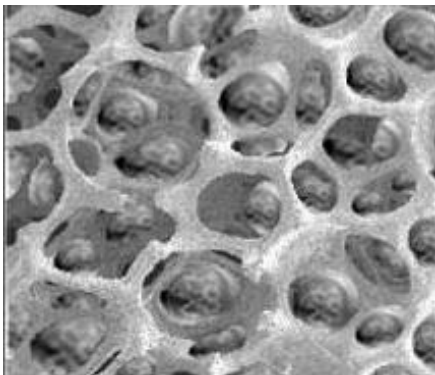
**Figura 2b. 500X Cristales de HAP/Q, con diferentes características.**



**Figura 2c, a 1000X, Presencia de las partículas prismáticas de HAP**



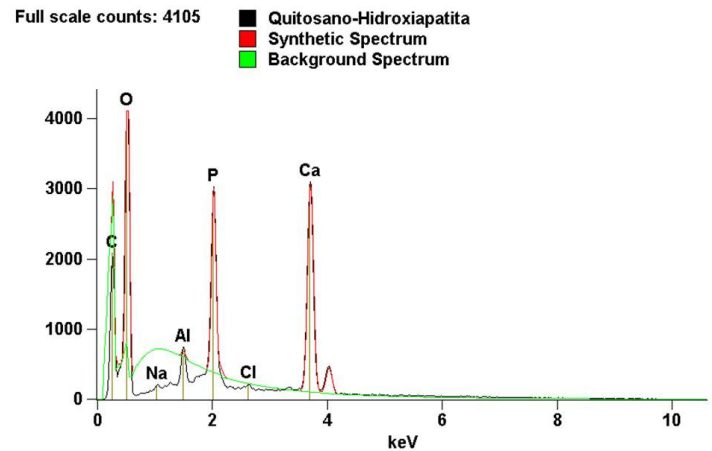
globulares y grupos pequeños de cristales. En la figura 2b a 500x se observa más claramente los cristales y el polímero, con diferentes características. La HAP en dependencia del componente inorgánico presente en los compuestos, variabilidad geométrica y estequiometricamente estable, lo cual es directamente proporcional a la funcionalidad clínica. En la figura 2c, a 1000X, ya es más clara la presencia de las partículas prismáticas de gran tamaño y forma tridimensional necesario para el alojamiento celular esperable como se esquematiza en la figura 2d.



**Figura 2d. Esquema de alojamiento celular.**

Con la finalidad de determinar el contenido estructural de la membrana se decidió realizar un EDX grafico 1, los componentes más predominantes fueron: O, C, P y Ca en proporciones más bajas Al y en trazas Cl y Na. Los constituyentes individuales de los compuestos de HAP basados en Q, mantienen su identidad físico-química; es decir, no se disuelven o fusionan completamente uno en el otro, de modo que, pueden normalmente ser identificadas de forma independiente la fase inorgánica y la matriz polimérica. No obstante, ambas pueden interactuar a través de los grupos amino reactivo del Q y los grupos

fosfato e hidroxilo y los iones calcio de la HAP, favoreciendo de esta manera la respuesta clínica.



**Grafico 1. EDX de la muestra de HAP/Q.**

### PROCEDIMIENTO CLINICO

Se procedió a realizar intervención quirúrgica que consistió en: enucleación del quiste, apicectomía obturación retrograda con material restaurador intermedio (IRM) y relleno de la cavidad con Q y HAP dentro de la lesión y como barrera para evitar la infiltración del tejido blando dentro de la lesión figura 3.



**Figura 3. Levantamiento del colgajo y colocación de la membrana de HAP/Q.**

En la figura 4a se observa, el primer registro radiográfico al mes de la intervención quirúrgica, observándose una franca disminución de la circunferencia del defecto óseo, aumento de la radio opacidad característica del tejido, la figura 4b es el segundo registro radiográfico a los tres meses, donde ya la regeneración ósea se hace evidente observándose islotes óseos típicos de proliferación celular (indicados por la cabeza de flecha).



**Figura 4a. Registro radiográfico al mes de la intervención.**



**Figura 4b. Registro radiográfico a los tres meses de la intervención.**

## DISCUSIÓN

Ensayos biológicos con diferentes células han demostrado la biocompatibilidad de los compuestos de HAP/Q,<sup>13</sup> como se esperaba al igual que en este estudio la respuesta del huésped a la membrana fue muy apropiada, ya que tanto morfológica, estructural y biológicamente tuvo un rendimiento adecuado. Son numerosos los estudios que han demostrado que la bioactividad de un material compuesto, está dada por la propiedad para formar una capa de carbohidroxiapatita biológicamente activa

sobre su superficie, lo cual facilitará la unión interfacial con el tejido óseo, garantizando un enlace directo con el hueso sin interposición de una cápsula fibrosa, logrando una buena integración material-hueso, que permite la presencia de células óseas necesarias para el proceso de regeneración sobre la superficie del material,<sup>14</sup> este tipo de resultados son visibles radiográficamente cuando la magnitud del defecto inicial se ve reducida posterior a la colocación de la membrana previa remoción química como se demuestra en este estudio, cabe destacar que el estudio del EDX demuestra grandes cantidades de C y HAP, como parte de la formulación de la membrana. La biodegradabilidad de los sistemas es otra importante propiedad que debe tenerse en cuenta para su selección y el Q contribuye favorablemente en ello. Es fundamental garantizar un proceso dinámico de formación y reabsorción de tejido óseo, donde estos materiales hacen la función de andamio para la infiltración y sustitución de los tejidos, y a su vez estimulan el crecimiento celular a través suyo,<sup>15</sup> este estudio demuestra la capacidad de andamiaje de la membrana cuando permite la presencia celular, demostrada en los estudios radiográficos presentados.

## CONCLUSIONES

Las biocerámicas de fosfatos de calcio como la HAP, son biocompatibles, bioactivas y osteoconductoras, propiedades estas que las convierten en excelentes biomateriales para regeneración ósea. Las formulaciones de composites basados en polímeros naturales como el quitosano y la gama de métodos de obtención para su preparación, han permitido obtener materiales con un mejor y más adecuado

diseño, fortaleza incrementada y superior osteoconductividad, homogeneidad, bioactividad, biodegradabilidad y similitud al tejido óseo que se desea regenerar, por lo que se amplía su aplicación. La tendencia actual es desarrollar andamiajes tridimensionales de

compuestos con propiedades incrementadas, a partir de materiales inorgánicos con los que se intenta conseguir una adecuada proliferación celular y una más rápida y eficiente formación y mineralización del tejido óseo dañado.

## REFERENCIAS

1. Ochandiano S. Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales aloplásticos. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.* 2007; 29(1): 21-32.
2. Del Valle Sol C, García-Arocha R, Bellorín M, López P. Uso de la regeneración ósea guiada (rog) con membranas biodegradables de co-polímeros en cirugía bucal para reparar defectos óseos: estudio clínico de 30 meses de seguimiento postquirúrgico. *Acta odontol. venez.* 2010; 48(1): 31-36.
3. Donos N, Mardas N, Chadha V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). *J Clin Periodontol* 2008; 35 (suppl. 8):173-202.
4. Li F, Liu Y, Ding Y, Xie Q . A new injectable in situ forming hydroxyapatite and thermosensitive chitosan gel promoted by Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. *Soft Matter.* 2014 Apr 7;10(13):2292-303.
5. Song JM, Shin SH, Kim YD, Lee JY, Baek YJ, Yoon SY, Kim HS. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis *Pnt J Oral Sci.* 2014 Apr 11;6:0. doi: 10.1038/ijos.2014.16. [Epub ahead of print]
6. Itoh S, Suzuki M, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J. Developmant of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube. *Artificial organs.* 2003; 7(2):1079-1088.
7. Bartold M, Xiao Y, Lynsgstaadas S, Paine M, Snead M. Principles and Applications of Cell Delivery Systems for Periodontal Regeneration. *Periodontology.* 2006; 4(1):123-135
8. Lee Y, Park Y, Lee S, Chung CH. The bone regenerative effect of platelet derived growth factor BB delivered with a chitosan /tricalcium phosphate sponge carrier *J. Periodontol* 2000 ;7(1) :418-424
9. Rodrigo Jorquera Cortés, Orlando Jorquera Cortés, Sonia Rivera Alvarez, Brasil Quitosano: un Material con Propiedades Regenerativas y su Aplicación Clínica *Rev Eur de Odontoest.* 2008; 7(1): 47-55
10. Paz Daniela, Sosa M, Dávila L, Velazco G, Arteaga S, Morales O, Díaz N. Efectividad del quitosano como coadyuvante en el tratamiento local de la periodontitis crónica. *Acta Bioclinica.* 2012; 2(4)112-134.

11. Hua Y, Ning C, Xiaoying L, Buzhong Z, Wei C, Xiaoling S. Natural hydroxyapatite/ chitosan composite for bone substitute materials. *Eng Med Biol Soc* 2005; 5(4):888-891.
12. Velazco G, Ortiz R, González A. Nuevas terapéuticas para regeneración ósea a base de hidroxiapatita y quitosano. *Acta Microscópica Venezolana*. 2011;20, Suplemento A
13. Tang X, Gui L, Lü XY. Hard tissue compatibility of natural hydroxyapatite/chitosan composite. *Biomed Mater*. 2008; 3(4):441-415.
14. Sailaja G, Ramesh P, Kumary TV, Varma HK. Human osteosarcoma cell adhesion behaviour on hydroxyapatite integrated chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex. *Acta Biomater*. 2006;2(6):651-7.
15. Li Z, Yubao L, Aiping Y, Xuelin P, Xuejiang W, Xiang Z. Preparation and in vitro investigation of chitosan/nanohydroxyapatite composite used as bone substitute materials. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16(3):213-219.