



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Preparación y caracterización de un sustituto óseo inyectable de Hidroxiapatita/Biopolímero/Tetraciclina para ingeniería de tejidos del complejo maxilofacial**

Laura Sofía Osorio Vélez

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales  
Medellín, Colombia  
2018

# Preparación y caracterización de un sustituto óseo inyectable de Hidroxiapatita/Biopolímero/Tetraciclina para ingeniería de tejidos del complejo maxilofacial

**Laura Sofía Osorio Vélez**

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:  
**Magister en Ingeniería de Materiales y Procesos**

Director

Dra. Claudia Patricia Ossa Orozco

Codirector:

Dr. Juan Manuel Vélez Restrepo

Línea de Investigación:

Biomateriales

Grupo de Investigación:



Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Minas, Departamento de Materiales y Minerales  
Medellín, Colombia  
2018

*“Mientras mayores la isla del conocimiento, más grandes son las riberas del asombro” (Ralph M. Sockman)*

## Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un sustituto óseo inyectable compuesto de carragenano-hidroxiapatita y doxiciclina, que es un tipo de tetraciclina, que sea adecuado para el uso en patologías del complejo maxilofacial ya sean estas derivadas de traumas, infecciones dentales o periodontales y patologías óseas. Se realizaron pruebas mecánicas, de inyectabilidad, degradación, zimografía, antibacterianas y de citotoxicidad que demostraron la aplicación potencial de este material para la rehabilitación oral del paciente adulto, especialmente aquellos afectados por enfermedades o condiciones sistémicas con repercusiones orales como la diabetes, osteoporosis, fumadores pesados y estados post-menopausicos. Se pudo concluir que los tres materiales precursores se complementan en sus funciones como andamio (polímero- carragenano), refuerzo estructural (cerámico-hidroxiapatita), medicamento inmunomodulador (doxiciclina dosis subantimicrobiana); simulando las condiciones del hueso humano, pero mejorando la respuesta biológica especialmente en pacientes con compromisos metabólicos asociados. Se obtuvo entonces, un biomaterial como sustituto óseo promisorio, especialmente en pacientes con compromisos metabólicos que se favorecen mucho en el campo de la inmunomodulación de tejidos; más allá de la ingeniería de tejidos tradicional con un dispensado inyectable que le da adecuada manipulabilidad y conformabilidad según la geometría de cada defecto óseo en particular.

Palabras clave: Huesos, hidroxiapatita, carragenano, biopolímeros, doxiciclina, maxilares, periodontitis.

## Abstract

The present work has as objective to develop an injectable bone substitute composed of carrageenan-hydroxyapatite and doxycycline that is a type of tetracycline suitable for use in pathologies of the maxillofacial complex whether these are derived from trauma, dental or periodontal infections and bone pathologies. Mechanical, injectability, degradation, zymography, antibacterial and cytotoxicity tests were performed, demonstrating the potential application of this material for the oral rehabilitation of the adult patient, especially those affected by diseases or systemic conditions with oral repercussions such as diabetes, osteoporosis, heavy smokers and post-menopausal states. It was possible to conclude that the three precursor materials complement each other in their functions as scaffolding (polymer-carrageenan), structural reinforcement (ceramic-hydroxyapatite), immunomodulatory drug (doxycycline subantimicrobial dose) simulating human bone conditions, but improving the biological response especially in patients with associated metabolic compromises. A biomaterial is then obtained as a promissory bone substitute, especially in patients with metabolic compromises that favor much of the field of the immunomodulation of tissues beyond traditional tissue engineering with an injectable dispensing that gives it adequate manipulation and conformability to the geometry of every bone defect in particular.

Key words: Bones, hydroxyapatite, carrageenan, biopolymers, doxycycline, maxilla, periodontitis.

Contenido	Pag.
Resumen	5
Abstract	6
Resumen gráfico	10
Lista de figuras	11
Lista de tablas	15
Lista de símbolos	18
Introducción	19
Bibliografía	25

## SECCIÓN I

### Fundamentación teórica y antecedentes

Capítulo 1. Biología ósea	29
1.1 Componente celular	31
1.2 Matriz celular	32
1.3 Hueso maxilar y dentoalveolar	33
1.4 Enfermedades sistémicas y compromiso óseo	36
Capítulo 2. Biomateriales e ingeniería de tejidos	37
2.1 Introducción	37
2.2 Antecedentes en ortopedia y odontología	38
2.3 Sustitutos óseos	39
Capítulo 3. Polímeros naturales	43
3.1 Clasificación y uso en ingeniería de tejidos	43
3.2 Carragenano	46
Capítulo 4. Fosfatos de calcio	48
4.1 Bioapatitas	48

4.2 Apatitas sintéticas	49
Capítulo 5. Tetraciclinas	51
5.1 Actividad anticolagenolítica de las tetraciclinas	52
5.2 Antecedentes	53
5.3 Aplicaciones en ingeniería de tejidos	54
5.4 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)	55

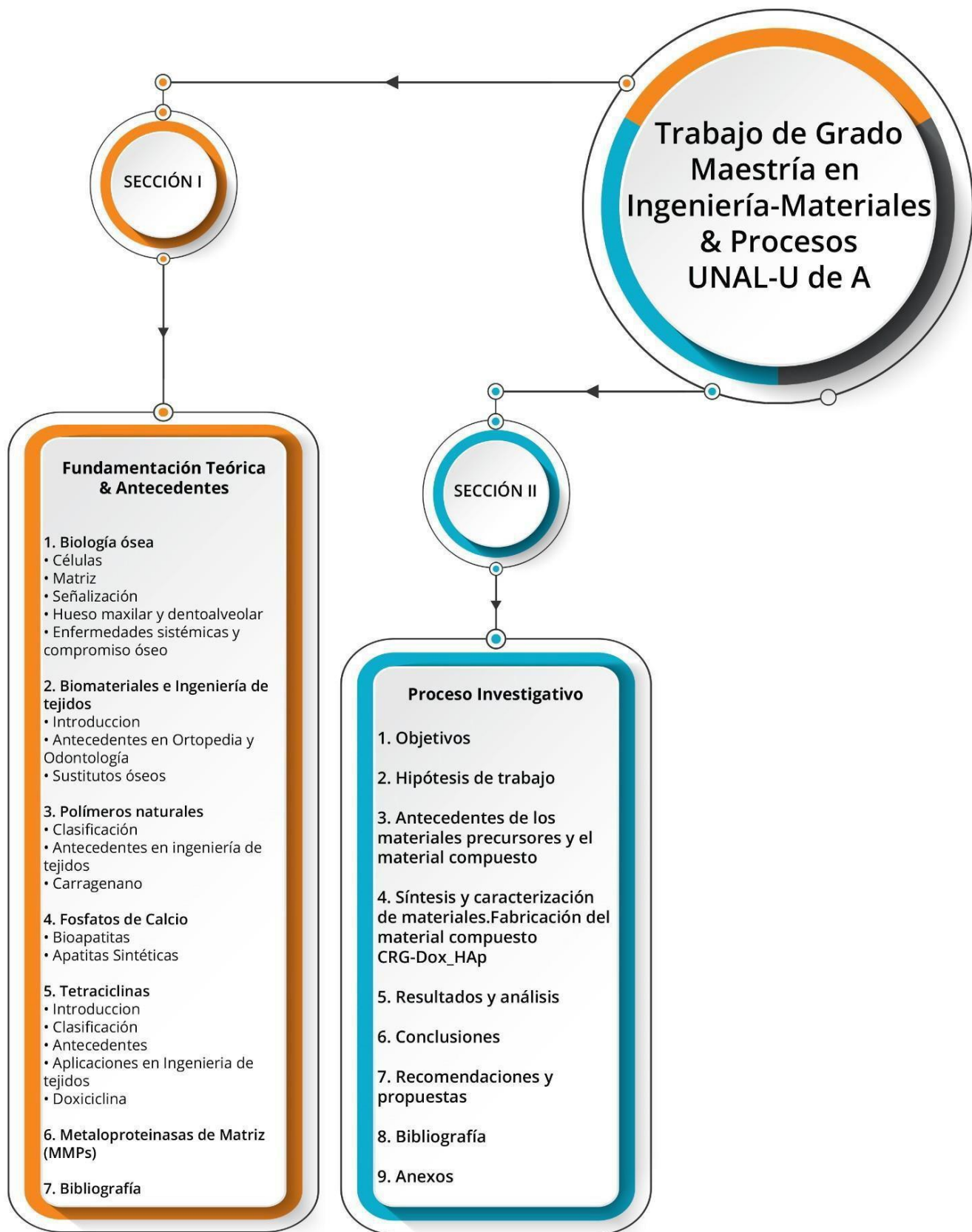
## SECCIÓN II

### Investigación científica para el desarrollo de un compuesto Hidroxiapatita-Carragenano-Doxiciclina (HAp/CRG/Dox)

1. Objetivos	59
2. Hipótesis de trabajo	60
3. Antecedentes de los materiales precursores y compuestos	61
4. Síntesis y caracterización de materiales	66
4.1 Materiales precursores	66
4.1.1 Hidroxiapatita sintética	66
4.1.2 Carragenano comercial	67
4.1.3 Doxiciclina hiclato grado analítico de PAN Tech	67
4.2 Material compuesto HAp/CRG/Dox	67
4.2.1 Proceso de fabricación del sustituto compuesto inyectable HAp/CRG/Dox	67
4.2.2 Caracterización mecánica	69
4.2.3 Inyectabilidad	69
4.2.4 Cinética de degradación	70
4.2.5 Actividad antimicrobiana	71
4.2.6 Citotoxicidad	72
4.2.7 Actividad antimetaloproteinasas	73
4.3 Análisis estadístico	74
5. Resultados y análisis	74
5.1 Materiales precursores	74
5.1.1 Hidroxiapatita sintética	74
5.1.2 Carragenano comercial	79

5.1.3 Doxiciclina hclato comercial	81
5.2 Material compuesto Hidroxiapatita-Carragenano-Doxiciclina	83
5.2.1 Caracterización mecánica	83
5.2.2 Inyectabilidad	86
5.2.3 Cinética de degradación	92
5.2.4 Bioactividad	103
5.2.5 Citotoxicidad	114
5.2.5 Actividad antimetaloproteínas por electroforesis SDS-PAGE	117
6. Conclusiones	129
7. Recomendaciones propuestas	131
8. Anexos	
A. Anexo Ficha técnica Carragenano Caisson laboratorios	133
B. Anexo Ficha técnica Doxiciclina HclatoPan Biotech®	135
C. Anexo Reactivos y elaboración de fluido fisiológico simulado (SBF) según Kokubo	143
Bibliografía	144





*\* Resumen gráfico*

# Lista de Figuras

INTRODUCCIÓN	Pag.
Figura 1. Esquema de las aplicaciones maxilofaciales de los sustitutos óseos. A. Elevación de seno maxilar en cirugía de implantes de ose-integración, B. Compromisos de bi y trifurcaciones en terapia periodontal quirúrgica, C. Preservación de alvéolos. Complemento de implantes de oseointegración en el gap implante-hueso nativo, E. Fractura de huesos cigomáticos y maxilares. Fuente propia	21
SECCIÓN I	
Figura 1. Esquema de hueso trabecular y compacto	29
Figura 2. Composición estructural del hueso	30
Figura 3. Organización jerárquica del hueso	30
Figura 4. Celulas, ubicación y función	31
Figura 5. Resumen de las moléculas más importantes en la señalización en el proceso de formación ósea	32
Figura 6. Resumen del proceso de cicatrización según Wang y Yeung	33
Figura 7. Esquemización de las calidades óseas según Lekholm y Zarb	34
Figura 8. Fotografía de maxilar superior y dentición 13 a 25 en sus procesos alveolares	36
Figura 9. Tipos de agarre de jeringas quirúrgicas. A) Tipo disparo, B) Disparo modificado, C) Tenar, D) Dos manos	42
Figura 10. Esquema de tipos de carragenano. Pertenecientes a la familia de galactanos sulfatados lineares hidrofílicos	47
Figura 11. Fotografía <i>Kappaphycus alvarezii</i> húmeda y seca	48
Figura 12. Esquema de celda unitaria simplificada de HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	51
Figura 13. Esquema de las estructuras moleculares de las tetraciclinas	52
Figura 14. Esquema de la estructura básica de las metaloproteinasas de matriz	58

## SECCIÓN II

Figura 1. Resumen gráfico del protocolo de preparación del material compuesto HAp-CRG-Dox	69
Figura 2. Esquema del experimento de inyectabilidad	70
Figura 3. A) Fotografía de agares Müeller-Hinton para crecimiento <i>E. coli</i> , B) Fotografía de esterilización de agares en autoclave	72
Figura 4. Esquema de los principales componentes del equipo Miniprotean Biorad® para electroforesis en gel. Se muestra: cubeta de electroforesis, soportes de vidrios, vidrios y peines para diferentes cantidades de pozos	73
Figura 5. Micrografía de la nanohidroxiapatita sintetizada, se miden las longitudes de las nanobarras	75
Figura 6. Micrografía de la nanohidroxiapatita sintetizada, se miden los anchos de las nanobarras	76
Figura 7. Comparativo de dos muestras de HAp con patrón COD	77
Figura 8. Difractograma de HAp con pH corregido	78
Figura 9. Espectroscopía infrarrojo de nanoHAp obtenida y sus bandas características	79
Figura 10. Espectroscopía infrarrojo del carragenano comercial	82
Figura 11. Espectroscopía infrarrojo obtenida de la doxiciclina hclato Pan Biotech	83
Figura 12. Resistencia a la compresión del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas	84
Figura 13. Diagrama de cajas y bigotes de la resistencia compresiva del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hclato	84
Figura 14. Comparación de medias para ensayo de compresión del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hclato	86
Figura 15. Control de calidad de jeringas vacías	87
Figura 17. Observaciones de jeringas llenas	87
Figura 18. Comportamiento de inyección de sustitutos subantimicrobianos	88
Figura 19. Fenómeno de separación de fases en material inyectable	89
Figura 20. Diagrama cajas y bigotes del porcentaje de extrusión de sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hclato	90
Figura 21. Gráfico para el peso de material no extruido	92

Figura 22. Diagrama cajas y bigotes de prueba de degradación (medición de pH) del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hclato	92
Figura 23. Diagrama cajas y bigotes de prueba de degradación, factor pH del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hclato	93
Figura 24. Comportamiento del pH en sus primeras horas del día de haber iniciado el experimento	95
Figura 25. Especies químicas del SBF en solución acuosa	97
Figura 26. Esquema explicativo que muestra la disociación del bicarbonato de sodio en agua y las especies derivadas que pueden modificar el pH de la solución	98
Figura 27. Esquema explicativo que muestra la disociación del fosfato ácido de potasio en agua y las especies derivadas que pueden modificar el pH de la solución	98
Figura 28 Diagrama cajas y bigotes de peso húmedo del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina o día de evaluación	99
Figura 29. Diagrama de cajas y bigotes del peso seco en prueba de degradación (secado a 50 °C por 50 minutos)	102
Figura 30. Control sustituto óseo no sumergido en SBF	103
Figura 31. Sustituto óseo en SBF 3 días A. Sin doxiciclina, B. Con doxiciclina subantimicrobiana (0,2 µg/mL)	103
Figura 32. Sustituto doxiciclina subantimicrobiano (0,2 µg/mL) 7 días en SBF	104
Figura 33. EDX del material compuesto sumergido en SBF durante A. 3 días, B. 7 días	102
Figura 34. Bioactividad de los sustitutos óseos evaluada a través de ATR-FTIR	105
Figura 35. Diagrama cajas y bigotes del efecto antibacteriano en la bacteria <i>P. gingivalis</i> del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina	107
Figura 36. Diagrama cajas y bigotes del efecto antibacteriano del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina antibacteriana	
Figura 37. Agar para <i>E. coli</i> con A. Sustitutos subantimicrobianos, B. Sustituto antimicrobiano	111
Figura 38. Diagrama cajas y bigotes del efecto antibacteriano en la bacteria <i>E. coli</i> del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina	
Figura 39. Viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos con los sustitutos óseos	114

Figura 40. Diagrama de cajas y bigotes de la prueba de citotoxicidad del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina	115
Figura 41. Evaluación cualitativa de proteínas de alto peso molecular	118
Figura 42. Valoración cualitativa de proteínas de bajo peso molecular	117
Figura 43. Análisis de bandas de de bajo peso molecular de concentraciones 0,2 Dox, 2 Dox, 20 Dox y 200 Dox	
Figura 44. Valoración cuantitativa de HMV punto diámetro MMP-9. 0,2 Dox, 2 Dox, 20 Dox y 200 Dox	121
Figura 45. Análisis de bandas de degradación preteolítica en posición dímero MMP-9, concentraciones de doxiciclina 0,2 Dox, 2 Dox, 20 Dox y 200 Dox	
Figura 46. Valoración cuantitativa de HMW. Complejo MMP9-TIMP	122
Figura 47. Cuantitativo MMP-2. Gelatinasa B latente 72 KDa	123
Figura 48. Análisis cuantitativo de MMPs de bajo peso molecular (LMW) MMP-1 latente 55KDa**: este valor ya corresponde a la primera muestra de sustituto con Dox	124
Figura 49. Carta de control MMP-9-TIMP	125
Figura 50. Diámetro MMP-9	126
Figura 51. Radiopacidad comparativa de (A) 10 mg HAp sola (inferior derecha), sustituto óseo sin Ba (inferior izquierda), 10 mg de Ba solo (superior derecha) y sustituto HAp+CRG-Dox + 0,5 g Ba (B) Sustituto óseo con 0,5 g de Ba en espesor mínimo de jeringa (derecha) y espesor central 3mm (izquierda)	128

## Lista de tablas

### SECCIÓN I

Tabla 1. Clasificación de injertos para reemplazos óseos	41
Tabla 2. Polímeros en ingeniería de tejidos	43
Tabla 3. Clasificación de polímeros según el origen	45
Tabla 4. Propiedades físicas de los carragenanos	46
Tabla 5. Ortofosfatos	49
Tabla 6. Resumen de las metaloproteinasas de matriz o matrixinas	56
Tabla 7. Condiciones fisiológicas y patológicas en las que intervienen las MMPs	57

### SECCIÓN II

Tabla 1. Parámetros para síntesis de nanohidroxiapatita por la técnica de precipitación/tratamiento hidrotermal	66
Tabla 2. Nomenclatura de las concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina usadas	68
Tabla 3. Nomenclatura de las concentraciones de doxiciclina en los sustitutos con potencial acción antimicrobiana	68
Tabla 4. Componentes elementales de la nanoHAp obtenida	76
Tabla 5. Prueba de Shapiro-Wilk para ensayo de compresión del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato	85
Tabla 6 Prueba de Kruskal Wallis para ensayo de compresión del sustituto sin doxiciclina y con las cinco concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato	85
Tabla 7. Resumen del porcentaje de material extruido por contenido de dosis subantimicrobianas de	90

doxiciclina.

Tabla 8. Prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad de residuos para la prueba de inyectabilidad	91
Tabla 9. Prueba de homocedasticidad para la varianza de porcentaje de extrusión	91
Tabla 10. Análisis ANOVA para porcentaje de extrusión	91
Tabla 11. Prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad en los residuos en el análisis de pH	93
Tabla 12. Homocedasticidad en la varianza de los residuos en análisis de pH (prueba de Bartlett)	94
Tabla 13. Resumen de prueba Kruskal-Wallis de pH por concentración y días	94
Tabla 14. Estadísticos de resumen para la variación de pH	96
Tabla 15. Resumen de ANOVA para peso húmedo en prueba de degradación	100
Tabla 16. Prueba de Shapiro-Wilk para degradación	100
Tabla 17. Prueba de homocedasticidad de la varianza de peso húmedo	101
Tabla 18. Prueba post-hoc de Tukey para variación de peso húmedo	101
Tabla 19. Test Shapiro-Wilk para la normalidad de residuos para degradación (peso seco)	102
Tabla 20. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis para degradación (peso seco)	103
Tabla 21. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para <i>P. gingivalis</i>	108
Tabla 22. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis para <i>P. gingivalis</i>	109
Tabla 23. Prueba de Tukey para comparación de medias según diámetro de inhibición del experimento	109
Tabla 24. Prueba de normalidad en residuos para prueba antimicrobiana en <i>E. coli</i>	112
Tabla 25. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis para <i>E. coli</i>	113
Tabla 26. Prueba Tukey para comparación de medias de experimento en <i>E. coli</i>	113

Tabla 27. Prueba Shapiro-Wilk para la prueba de citotoxicidad	115
Tabla 28. Prueba de Bartlett para la homocedasticidad de la varianza de la prueba de citotoxicidad	116
Tabla 29. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis en la prueba de citotoxicidad	116
Tabla 30. Comparaciones de supervivencia celular promedio a través de una prueba de Tukey	116
Tabla 31. Resumen de estadísticos para MMP9	123
Tabla 32. Estadísticos MMP1 y MMP2	124



## Lista de símbolos y abreviaturas

- *Carragenano: CRG*
- *Doxiciclina hiclato: Dox*
- *Hidroxiapatita pura: HAp*
- *MMPs: Metaloproteinasas de matriz (para los efectos de este texto, siempre va a hacer referencia a las MMPs producidas por células mamarias, aunque la sigla coincide con la que se usa para describir las MMPs que producen las bacterias pero que no son las principales moléculas que producen degradación tisular como se creía hace algunos años y no son objetivo de estudio de este trabajo)*
- *SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)*
- *CHX: Clorhexidina*
- *DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (por sus siglas en inglés)*
- *TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (por sus siglas en inglés)*
- *SEM: Microscopía electrónica de barrido (por sus siglas en inglés)*
- *DRX: Difracción de rayos X*
- *ATR-FTIR: Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier - Modo de transmisión o de reflectancia total atenuada (por sus siglas en inglés)*
- *SBF: Fluido corporal simulado (siglas en inglés)*

# Introducción

En el tratamiento del complejo dento-maxilo-facial es necesario desarrollar nuevos sustitutos óseos que sean osteoconductivos, osteoinductivos e idealmente osteogénicos. Los materiales desarrollados hasta el momento cumplen sólo parcialmente con estas características, no son completamente biodegradables y no presentan propiedades antibacterianas/antiresorptivas; además no consideran las variaciones en las condiciones médicas de los pacientes.

Después de los trasplantes sanguíneos, el trasplante de hueso es el tejido humano más frecuentemente trasplantado [1]. En el campo de la ortopedia y la odontología, el tratamiento de fracturas, defectos congénitos, pérdida de piezas dentarias, trastornos infecciosos y oncogénicos, demandan en conjunto aproximadamente unos 500.000 injertos óseos al año en Estados Unidos [2] y se encuentra un estimado mundial de 2,2 millones en el mundo [3]. Tal demanda sobrepasa fácilmente la oferta del hueso autólogo (propio paciente) y heterólogo (trasplante) disponible. El mercado global de los injertos óseos está estimado en 433,4 millones de dólares en el 2015, con una proyección de 857,7 millones de dólares en 2.022, según datos no oficiales.

Con respecto a las complicaciones más importantes de los injertos óseos se cuentan las infecciones postoperatorias que causan dolor, incapacidad y grandes costos a los pacientes y a los servicios de salud [4] [5], siendo más frecuentes en injertos tipo aloinjerto que en los autólogos [6]. Otras dificultades con los injertos, especialmente en el área maxilofacial, corresponden a la reabsorción parcial o total de éstos, produciendo pérdida de volumen y en ocasiones pérdida del implante. Las estadísticas a este respecto varían según el procedimiento, paciente, edad y técnica quirúrgica, entre otros [7] [8].

Por otro lado, la expectativa de vida tiene una ascendente tendencia en todos los países, independiente de sus condiciones socioeconómicas y las edades observadas. Sin embargo, tal aumento no siempre es sinónimo de una vida saludable y libre de discapacidades. Los estudios epidemiológicos indican que un 11 % de la población mundial actual es mayor de 60 años y la predicción de un aumento de este valor es a 22 % en el 2050 [9].

En este sentido, se han conducido numerosos estudios poblacionales como el GBD (*Global Burden Disease*), que en un estudio independiente donde evaluaron las causas de morbi-mortalidad y discapacidad de más de 290 países en un periodo de 20 años (1990-2010), analizando las enfermedades crónicas más prevalentes e incapacitantes, encontraron que las enfermedades orales han sido y son los problemas más prevalentes tanto en Colombia como en países desarrollados como Estados Unidos. En la población colombiana ha llegado a ser una de las 10 principales enfermedades no transmisibles que más incapacidades o discapacidades causa [10]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor del mundo el 60 a 90 % de los jóvenes y casi el 100 % de los adultos tienen caries o restauraciones dentales, así como enfermedad periodontal severa en el 15 a 20 % de los adultos en edades entre los 35 y los 44 años, que llevan a la pérdida de dientes y la discapacidad concomitante. Al menos el 30 % de la población mundial en edades entre los 65 y los 74 años sufre de edentulismo (pérdida de dientes naturales). Considerando, además, que el trauma dentofacial cuenta con una incidencia de 16 a 40 % en niños de 6 a 12 años [11], uno de cada cuatro estudiantes de escuela y casi un tercio de los adultos han sufrido lesiones en sus dientes permanentes [12]; la magnitud de las necesidades de rehabilitación resulta alarmante.

Los estudios acerca de la incidencia anual de pérdida dentaria muestran cifras preocupantes. Un seguimiento de 4 años en Brasil [13] señala la pérdida de 1 o más dientes en un periodo entre 2004 y 2008 en el 6,8 % de los 273 adultos mayores monitoreados y el 12,5 % llegaron a estar edentados totales en este periodo. En un estudio observacional longitudinal en Suiza de seguimiento a 208 pacientes adultos mayores, encontraron una tasa de pérdida dentaria de más de 2 dientes en el 13 % de grupo en un periodo de 10 años [14]; en una población mexicana más joven, de 39 a 49 años, el edentulismo total fue del 15 % [15]. En una observación global, se encontró en 2010 que 158 millones de personas alrededor del mundo eran edentados [16] [17].

En una población similar a la colombiana, se encontró casi un 34 % de edentulismo en adultos mayores de 65 años [18], en el país según el ENSAB IV (IV Estudio nacional de salud bucal), el 70,43 % de las personas ha perdido 1 o más dientes. Entre estos, la población de 65 a 79 años presenta la más alta prevalencia con un 98,9 %. En cuanto a trauma dental en Colombia, definido en el ENSAB (Estudio Nacional de Salud Bucal) como “lesión en boca, que puede afectar dientes, labios, encía, lengua y maxilares como consecuencia de accidentes en actividades deportivas y recreativas, hechos violentos; entre otros”, presenta una prevalencia del 16,52 % de la población colombiana [19].

La pérdida y reemplazo de las estructuras dentarias tiene una estrecha relación con el sistema óseo cortico-medular que los soporta, retiene y nutre. Se estima que 2 de cada 3 adultos norteamericanos tiene 1 o más

ausencias dentarias y de acuerdo a la academia americana de implantología oral, tres millones de norteamericanos tienen implantes dentales y una tasa creciente de 500.000 por año y estima un mercado de 4,2 billones en el 2020 entre Estados Unidos y Europa. Se calcula un mercado de 6,4 billones de dólares en Estados Unidos entre implantes y suministros protésicos [20].

Otros defectos de tamaño no crítico [21] en el complejo maxilofacial como cavidades post-resección de quistes, elevación de seno maxilar, defectos periodontales intraóseos [22] (regeneración ósea guiada ROG) y alvéolos post-extracción requieren materiales de regeneración ósea para devolver forma y función al órgano o para permitir la colocación de implantes osteointegrados (Figura 1).

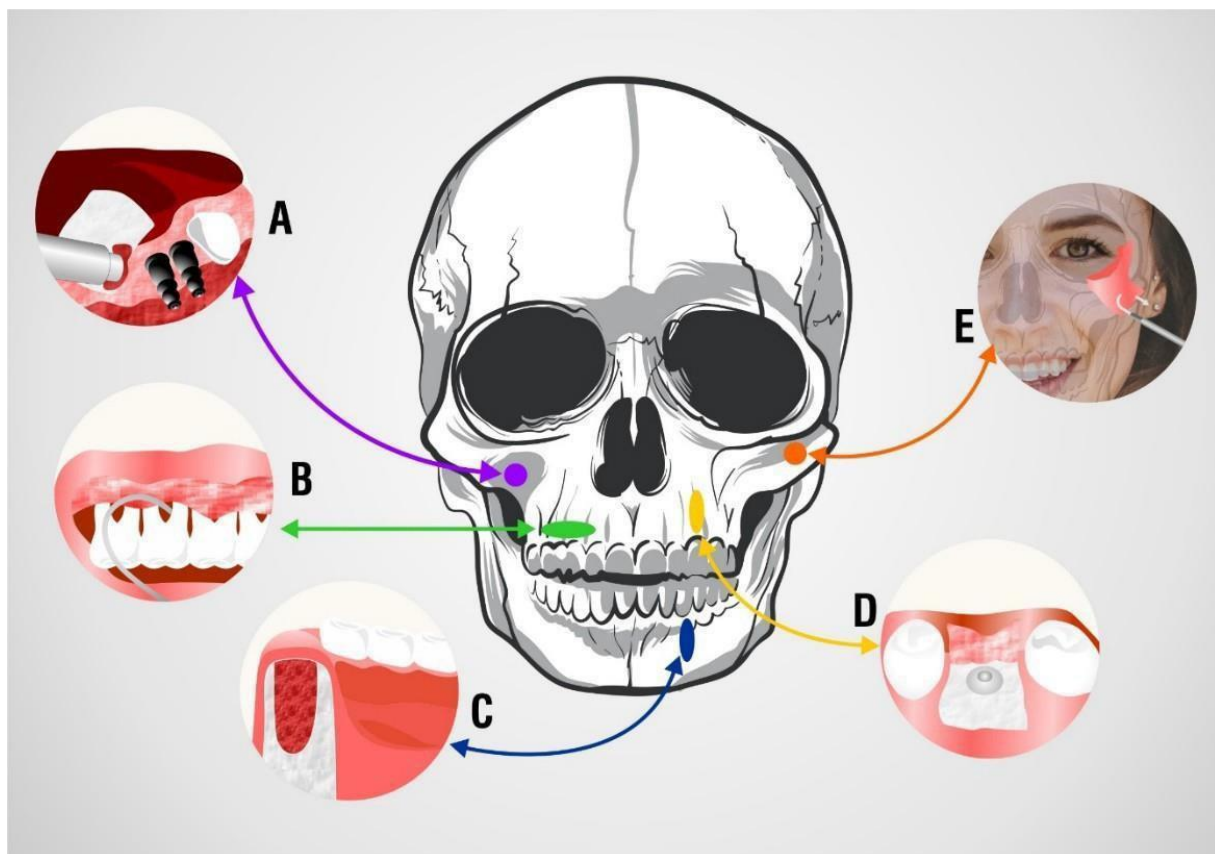


Figura 1. Esquema de las aplicaciones maxilofaciales de los sustitutos óseos. A. Elevación de seno maxilar para dar espacio a implantes de oseointegración, B. Compromisos de bi y trifurcaciones en pacientes con enfermedad periodontal, C. Preservación alveolo, D. Complemento de implantes de oseointegración en el gap implante-hueso nativo, E. Fracturas de huesos cigomáticos y maxilares. Fuente propia

Es importante también resaltar que la cavidad oral se considera una estructura vital para el cuerpo humano, pero a su vez es un reservorio de microorganismos conformado por una microbiota nativa fisiológica de tipo bacteriano,

fúngico y viral; con la particularidad de ser un medio de conexión entre el interior del cuerpo humano y el exterior [23]; como lo resalta Belibasakis y colaboradores al señalar que los dientes “son el único tejido duro del cuerpo humano comunicado directamente con el medio externo” [24].

Ante la evidencia y tan alta estadística, se puede considerar entonces que la pérdida dentaria y ósea del complejo cráneo maxilo-facial es un asunto de salud pública que requiere esfuerzos asociados del área clínica, pero de forma importante, del campo de la investigación de sustitutos óseos ideales que contribuyan de forma eficiente en lo que se ha denominado la prevención terciaria. El reemplazo oportuno del tejido óseo, ya sea de manera intraalveolar post-extracción o en otros defectos del complejo maxilofacial evita la progresión del daño y posibilita la posterior rehabilitación de las zonas afectadas.

Es así como surge la pregunta problema de este proyecto, ¿es posible desarrollar un sustituto óseo inyectable que sea biocompatible, biodegradable y bioactivo con base en biopolímeros e hidroxiapatita que además inhiba el crecimiento bacteriano y la lisis tisular en los injertos óseos para la rehabilitación del complejo dento-cráneo-mandibular?

Si bien el hueso autólogo se considera *gold* estándar en defectos óseos del cuerpo humano y los sustitutos alógenos y xenógenos han resultado aceptables, las limitaciones en cuanto a cantidad disponible de los primeros y compatibilidad antigénica de los segundos, justifica la exploración de alternativas aloplásticas osteogénicas, osteoinductivas, osteoconductoras, biocompatibles y completamente biodegradables. La imposibilidad de estandarización del material lote a lote en los materiales alogénicos y xenogénicos es otro factor que impulsa el desarrollo de materiales sintéticos o compuestos.

En Colombia, además, es limitada la cantidad de bancos de hueso de origen humano disponible. La Fundación Cosme y Damián, fundada en Bogotá en 1991 es una institución privada, sin ánimo de lucro, de carácter humanitario y utilidad pública, pionera en América Latina. Esta fundación se especializó en el proceso y almacenamiento de tejidos gracias a un riguroso control de calidad y en mantener actualizadas las buenas prácticas en este campo de la medicina. Al igual que ésta, la Fundación *Tissue Bank* creada en 2003 se ofrece como otra alternativa en banco de huesos y tejidos que se encarga de rescatar, procesar, almacenar y distribuir tejidos del sistema músculo-esquelético (hueso, cartílago, tendones, ligamentos, fascias, meniscos) a los pacientes que lo requieran. Las sedes de la Fundación Cosme y Damián se encuentran en Bogotá y Cali mientras que las sedes en Colombia de *Tissue Bank* están en Medellín y Pereira. Para materiales óseos particulados, ambas opciones locales ofrecen injertos corticales y cortico-medulares, pero Cosme y Damián ofrece ambas

opciones desmineralizadas y liofilizadas, en tanto que *Tissue Bank* ofrece la opción cortico-esponjosa mineralizada liofilizada. *Tissue Bank* no ofrece en el momento hueso en bloque como la tira monocortical liofilizada de la Fundación Cosme y Damián. Por otro lado, los altos costos de materiales importados ya sea bovinos (Bioss®, MinerOss X®) o humanos (Puros®, MinerOss®), también justifican el desarrollo de nuevas opciones de biomateriales de reemplazo óseo sintetizados en el laboratorio para disponer de mayor cantidad (dada la alta demanda), sin sacrificar calidad y tasas de éxito.

Es paradójico observar que se encuentran diferentes implantes de oseointegración oral según consideraciones como tipo de hueso, localización en la boca (implantes más estéticos) o preferencias sobre materiales (implantes cerámicos o implantes cerámicos de Zr) pero no se encuentran sustitutos óseos que consideren las variaciones entre pacientes en este mismo sentido. Este trabajo, por lo tanto, se enfoca en considerar las diferencias sistémicas de los pacientes al momento de seleccionar los injertos óseos a utilizar, ya que dichas condiciones médico-odontológicas particulares influyen en el comportamiento de los biomateriales y a su vez, el sustituto adecuado puede mejorar la oseointegración en pacientes comprometidos.

Las ventajas de los fosfatos de calcio sintetizados en el laboratorio se encuentran bien documentadas [26], [27], [28]: biocompatibilidad, bioactividad, se pueden estructurar como osteoconductivos, bioseguros, reproducibilidad, similaridad al hueso, disponibilidad ilimitada y esterilizables.

Adicionalmente, existe un interés creciente por materiales biodegradables y ecológicos, los polímeros de origen natural poseen baja cristalinidad, baja temperatura de transición vítrea y gran elongación antes de la ruptura y cumplen con los requisitos antes mencionados.

Se plantea la posibilidad de que el componente polimérico comience su degradación y produzca la macro y microporosidades interconectadas que se requieren [29], para una óptima vascularización y señalización celular que se traduzca en un reemplazo del material injertado por un sistema óseo nativo como ha sido ya demostrado en estudios con el copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) [30] [31].

Al mismo tiempo que se busca un material biológica y mecánicamente adecuado, debe considerarse la “conformabilidad” del material y el acceso del material al sitio quirúrgico sin necesidad de causar un trauma mayor. En este sentido, el desarrollo de materiales inyectables se considera ideal, además esta presentación facilita la incorporación de células, factores de crecimiento, sustancias de señalización, antibióticos entre otros, el relleno de formas complejas con menor tiempo quirúrgico y de recuperación [32].

Por otro lado, los materiales de reemplazo protésico están sujetos a ataques bacterianos y especialmente en boca donde los procedimientos quirúrgicos quedan semi-expuestos en muchos casos o se exponen en el proceso de cicatrización inicial y de contracción de la herida, quedando en riesgo de infección y mayor resorción y degradación colagenolítico por acción de la inmunidad innata [33]. En otros casos, se produce pérdida de injertos e implantes a veces consideradas idiopáticas pero que en realidad tienen un trasfondo sistémico inherente a cada sujeto. A este respecto, la tetraciclina usada en forma tópica ha demostrado características superiores [34], puesto que se obtienen mayores concentraciones en el fluido crevicular que en sangre [35], promueven reinserción o regeneración periodontal [36], inhibe la actividad de las colagenasas y metaloproteinasas de matriz [37], genera unión a la pared dura de la bolsa periodontal de manera que se convierte en reservorio [38], tiene gran afinidad por la hidroxiapatita [39] y es un antibiótico de amplio espectro.

Por otro lado, los descubrimientos sobre los efectos de las dosis sub-antimicrobianas y/o tetraciclinas químicamente modificadas [37] [40] específicamente en el tejido óseo lo convierte en un medicamento de elección para ser vehiculizado en un sustituto óseo inyectable, puesto que ayuda en la inhibición de la destrucción de colágeno tipo I y otros constituyentes de matriz ósea [41] [42], en la inhibición de la reabsorción ósea vía osteoclastos [43], en el aumento en la actividad de los osteoblastos [44] y en el incremento en la cantidad de osteoblastos activos vs inactivos [45] [46].

Estas características favorecerían especialmente condiciones de desbalance metabólico como osteopenia, osteoporosis, periodontitis [47] [48], diabetes [49] [50] y fumadores pesados [51] (más de 10 cigarrillos/día). En el campo de los implantes dentales, la oseointegración es un fenómeno bien establecido desde hace más de 5 décadas y en un 99,8 % exitoso en términos de supervivencia, sin embargo, cada vez más implantes necesitan ser instalados en pacientes con preexistencias médicas importantes que comprometen la biología ósea o bien, entran en una de estas complicaciones metabólicas luego de haber sido implantados y no es conocido el procedimiento médico adecuado para tratarlas. Es decir, la investigación y desarrollo de nuevas técnicas y materiales se enfocan día a día en producir materiales en forma masiva bajo el supuesto de pacientes con necesidades orales, pero por lo demás sanos, situación que se podría decir es cada vez menos frecuente en una sociedad que no se está haciendo más joven.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] O. Faour, R. Dimitrou, C. A. Cousins y P. V. Giannoudis, "The use of bone graft substitutes in large cancellous voids: ¿Any specific needs? ", *Injury*, pp. S87-S90, 2011.
- [2] A. Greenwald, S. Boden, V. Goldberg, Y. Khan, C. Laurencin y R. Rosier, "The committee on biological implants: bone-graft substitutes: facts, fictions and applications ", *J. Bone Joint Surg Am*, pp. 98-103, 2001.
- [3] D. Giannoudis, H. Dinopoulos y E. Tsiridis, "Bone substitutes: an update", *Injury*, pp. S3:20-7, 2005.
- [4] J. M. Badia, A. L. Casey, N. Petrosillo, P. Hudson, S. Mitchell y C. Crosby, "The impact of surgical site infection on healthcare costs and patient outcomes: a systematic review in six european countries", *Journal of hospital infection*, in press.
- [5] S. Guler, E. Eroglu Ozseker y A. Akkaya, "Developing an antibacterial biomaterial", *European Polymer Journal* 54, pp. 326-337, 2016.
- [6] M. A. Flierl, W. R. Smith, C. Mauffrey, K. Irgit, A. E. Williams, E. Ross, G. Peacher, D. J. Hak y P. F. Stahel, "Outcomes and complication rates of different bone grafting modalities in long bone fracture nonunions: a retrospective cohort study in 182 patients", *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, pp. 8-33, 2013.
- [7] A. Meireles Borba, A. Borges, C. S. Vilarinho da Silva, M. A. Brozoski, M. d. G. d. G. Naclério-Homemb y M. Miloro, "Predictors of complication for alveolar cleft bone graft", *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 52, p. 174-178, 2014.
- [8] C. Knabe, A. Mele, P. Herbert Kann, B. Peleska, D. Adel-Khattab, H. Renz, A. Reuss, M. Bohner y M. Stiller, "Effect of sex-hormone levels, sex, body mass index and other host factors on human craniofacial bone regeneration with bioactive tricalcium phosphate grafts", *Biomaterials*, vol. 123, nº 48-62, p. 48-62, 2017.
- [9] C. Newgard y N. Sharpless, "Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities", *J Clin Invest*, pp. 946-950, 2013.
- [10] "Institute for health metrics and evaluation", University of Washington, 2017. [En línea]. Disponible en: <http://www.healthdata.org/colombia>. Último acceso: abril 30, 2017.
- [11] Organización mundial de la salud, «OMS Oral health Fact sheet N°318 April 2012,» 2017. [En línea]. Disponible en: [www.who.int/gho/es](http://www.who.int/gho/es). Último acceso: abril 30, 2017.
- [12] U. Glendor, "Epidemiology of traumatic dental injuries: A 12-year review of the literaturae", *Traumatol*, pp. 603-611, 2008.
- [13] R. De Marchi, J. Hilgert, F. Hugo, C. Santos, A. Martins y D. Padilha, "Four-year incidence and predictors of tooth loss among older adults in a southern Brazilian city", *Community Dent Oral Epidemiol*, pp. 396-405, 2012.
- [14] S. Fure, "Ten-year incidence of tooth loss and dental caries in elderly swedish individuals", *Caries Res*. pp.



462-9, 2003.

[15] M. A. Fernandez-Barrera, C. E. Medina-Solís, M. D. L. Márquez-Corona, S. Vera-Guzman, A. Ascencio-Villagran, M. Minaya-Sanchez y A. J. Casanova-Rosado, "Edentulismo en adultos de Pachuca, México: Aspectos sociodemográficos y socioeconómicos", *Rev. Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*, volumen 9, pp. 59-65, 2016.

[16] N. Kassebaum, E. Bernabé, M. Dahiya, B. Bhandari, C. Murray y W. Marcenes, "Global burden of severe tooth loss: a systematic review and Meta-analysis", *JDR*, p. 7 supl. 1, 2014.

[17] P. Petersen y T. Yamamoto, "Improving the oral health of older people: the approach", *Community Dent Oral Epidemiol*, pp. 81-92, 2005.

[18] A. Von Marttens, J. Carvajal, Y. Leighton, M. Von Marttens y L. Pinto, "Experiencia y significado del edentulismo de adultos mayores, atendidos en un consultorio de servicio chileno", *Rev. Clin. Implantol. Rehabil. Oral*, pp. 27-33, 2010.

[19] Ministerio de Salud Colombia, "ENSAB IV", 12 febrero 2016. [En línea]. Disponible en [https://www.minsalud.gov.co/\\_layouts/15/osssearchresults.aspx](https://www.minsalud.gov.co/_layouts/15/osssearchresults.aspx). Último acceso: abril 30, 2017.

[20] American academy of dental implant, "Dental implants facts and figures", 2017. [En línea]. Disponible en: [http://www.aaid.com/about/Press\\_Room/Dental\\_Implants](http://www.aaid.com/about/Press_Room/Dental_Implants). Último acceso: marzo 3, 2017.

[21] S. Ochandiano Caicoya, "Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales aloplásticos", *Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.*, vol. 29, nº 1, pp. 21-32, 2007.

[22] L. S. Karfeld-Sulzer y F. E. Weber, "Biomaterial development for oral and maxillofacial bone regeneration", *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2012; 38:264-70), vol. 38, pp. 264-70, 2012.

[23] C. C. Peck, "Putting the mouth into health: The importance of oral health for General health", de *Interface oral health science 2016. Innovative research on bionics—abionics intelligent interface*, Singapore, Springer, 2016, pp. 81-87

[24] G. N. Belibasakis, T. Thurnheer y N. Bostanci, "Infections associated with implanted dental devices", de *Biomaterials associated infection. Immunological aspects and antimicrobial strategies*, Groningen, Springer, 2013, pp. 249-271.

[25] M. Ebrahimi, M. G. Botelho y S. V. Dorozhkin, "Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research", *Materials Science and Engineering*, vol. 71, pp 1293–1312, *Materials Science and Engineering*, 2017.

[26] C. Kunert-Keil, F. Scholz, T. Gedrange y T. Gredes, "Comparative study of biphasic calcium phosphate with beta-tricalcium phosphate in rat cranial defects—A molecular-biological and histological study", *Annals of Anatomy*, vol. 199, pp. 79-84, 2015.

- [27] C. Schwartz, "Biphasic synthetic bone substitute use in orthopaedic and trauma surgery: clinical, radiological and histological results", *J. Mater.Sci. Mater Med*, pp. 821-825, 1999.
- [28] D. Le Nihouannen, "Integration of total bone marrow cells with increasing quantities of macroporous calcium phosphate ceramic granules", *J. Mater.Sci. Mater.Med*, pp. 1983-1990, 2007.
- [29] M. A. Lopez-Heredia, K. Sariibrahimoglu, W. Yang, M. Bohner, D. Yamashita, A. Kunstar, A. A. VanApeldoorn, E. Bronkhorst, R. Felix, S. C. Leeuwenburgh, K. Itatani, F. Yang, P. Salmon y J. Wolke, "Influence of the pore generator on the evolution of the mechanical properties and the porosity and interconnectivity of a calcium phosphate cement", *Acta Biomaterialia* nº 8, p. 404–414, 2012.
- [30] A. Roy, S. Jhunjunwala, E. Bay, M. Fedorchak, S. Little y P. Kumta, "Porous calcium phosphate-poly (lactic-co-glycolic) acid composite bone cement: a viable tunable drug delivery system", *Materials Science and Engineering*, vol. 59, pp. 92-101, 2016.
- [31] R. Félix Lanao, S. Leeuwenburgh, J. Wolk y, J. Hansen, "In vitro degradation rate of apatitic calcium phosphate cement with incorporated PLGA microspheres", *Acta Biomaterialia*, vol. 7, p. 3459–3468, 2011.
- [32] M.P. Ginebra, C. Canal, M. Espanol, D. Pastorino y E. Montufar, "Calcium phosphate cements as drug delivery materials", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, p. 1090–1110, 2012.
- [33] M. Faurischou y B. Niels, "Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation", *Microbes and Infection*, p. 1317–1327, 2003.
- [34] M. Quirynen, W. Teughels, M. De Soete y V. Stteenberghe, "Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects", *Periodontology 2000*, vol. 28, nº 1, pp. 72-90, 2002.
- [35] M. Tonetti M, M. Cugini M y J. Goodson, "Zero-order delivery with periodontal placement of tetracycline loaded ethylene vinyl acetate fibers", *J. Periodontal Res.*, vol. 35, pp. 243-249, 1990.
- [36] M. Dragoo, "A clinical evaluation of hand and ultrasonic instruments on subgingival debridement. 1. With unmodified and modified ultrasonic inserts", *Int J. Periodontics Restorative Dent.*, vol. 12, pp. 311-323, 1992
- [37] N. Allen, M. Sapadin y R. Fleischmajer, "Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications", *J. Am. Acad. Dermatol.*, pp. 258-265, 2006.
- [38] L. Christersson, O. Norderyd y C. Puchalsky, "Topical application of tetracycline-HCl in human periodontitis", *J. Clin. Periodontol.*, vol. 20, pp. 88-95, 1993.
- [39] A. Leszczyńska, P. Buczko P, W. Buczko W y M. Pietruska, "Periodontal pharmacotherapy – an updated review", *Advances in Medical Sciences*, vol. 56, pp. 123-131, 2011.

- [40] S. Holmes, K. Still, D. Buttle, N. Bishop y P. Grabowski, "Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors", *Bone*, vol. 35, pp. 471-478, 2004.
- [41] R. Craig, Z. Yu, L. Xu, R. Barr, N. Ramamurthy, J. Boland y L. Golub, "A chemically modified tetracycline inhibits streptozotocin-induced diabetic depression of skin collagen synthesis and steady-state type I procollagen mRNA", *Biochim Biophys Acta*, pp. 250-260, 1998.
- [42] L. Golub, H. Lee, M. Ryan, W. Giannobile y J. Payne, "Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms", *Adv Dent Res*, pp. 12-26, 1998.
- [43] T. Nagasawa, M. Arai y A. Togar, "Inhibitory effect of minocycline on osteoclastogenesis in mouse bone marrow cells", *Archives of oral biology*, pp. 924-931, 2011.
- [44] P. Sousa y M. H. Fernades, "Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone", *Archives of oral biology*, pp. 251-259, 2007.
- [45] Sasaki, H. Kaneko, N. S. Ramamurthy y L. Golub, "Tetracycline administration restores osteoblast structure and function during experimental diabetes", *The Anat Rec*, vol. 231, nº 1, pp. 25-34, 1991.
- [46] T. Sasaki, N. Ramamurthy y L. Golub LM, "Tetracycline administration increases collagen synthesis in osteoblasts of streptozotocin-induced diabetic rats: a quantitative autoradiographic study", vol.50, *Calcif Tissue Int*, pp. 411-419, 1992.
- [47] J. B. Payne y L. M. Golub, "Using tetracyclines to treat osteoporotic/osteopenic bone loss: from the basic science laboratory to the clinic", *Pharmacological Research*, p. 121-129, 2011.
- [48] T. Sasaki, N. Ohyori, Z. Debari, N. Ramamurthy y L. Golub, "Effects of chemically modified tetracycline, CMT-8, on bone loss and osteoclast structure and function in osteoporotic states", *Annals of the new york academy of sciences*, pp. 347-360, 1999.
- [49] L. Golub, H. Lee, G. Lehrer, A. Nemiroff y T. McNamara, "Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes: preliminary observations and a proposed new mechanism of action", *J. Periodontal. Res.*, pp. 516- 526, 1983.
- [50] S. Bain, N. Ramamurthy, T. Impeduglia y S. Scolman, "Tetracycline prevents cancellous bone loss and maintains near-normal rates of bone formation in streptozotocin diabetic rats", vol. 21, *Bone*, pp. 147-153, 1997.
- [51] P. Wong, J. Christie, J. Wark. "The effects of smoking on bone health", *Clinical Science*, 233-241, 2007

## SECCIÓN I

### 1. Fundamentación teórica y antecedentes

#### Capítulo 1. Biología ósea

El hueso es un tejido conectivo especializado fundamental para el soporte de los animales vertebrados, que se desarrolla por un complejo proceso de crecimiento (ostecondral e intramembranoso) junto con *modelado óseo* y se renueva por un proceso vitalicio de *remodelado óseo*.

Los huesos se componen de una estructura porosa, vascular y celular denominada hueso esponjoso o trabecular atrapado en una bicortical compacta, dura, delgada y poco vascular denominada córtex (Figura 1), resultando en un material compuesto que combina las ventajas estructurales conjuntas de sus componentes individuales para soportar la carga y la tensión. En la biología ósea de este sistema es importante reconocer el periostio y el endostio que recubren externa e internamente el córtex y poseen funciones de nutrición y recambio.

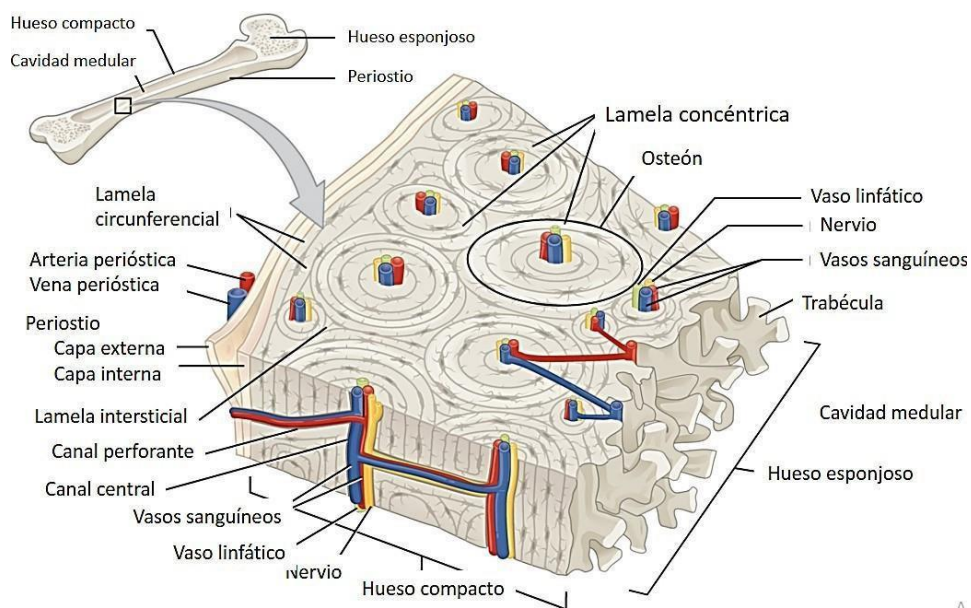


Figura 1. Esquema de hueso trabecular y compacto. Tomado y modificado de anatomía y fisiología de Open Stax College [1]

A nivel microscópico se diferencian el hueso reticular, en términos generales más inmaduro, presente en niños y en alvéolos dentales y el hueso lamelar más compacto, diferenciado y adulto.

Como lo describe Webster [2], el hueso es un complejo nanoestructurado compuesto de un 35 % de colágeno que le aporta rigidez y tenacidad, un 65 % de apatita carbonatada como refuerzo estructural, rigidez y homeostasis de la fase mineral; las proteínas no colágenas sirven de "malla" de soporte a las células y sus funciones (Figura 2).

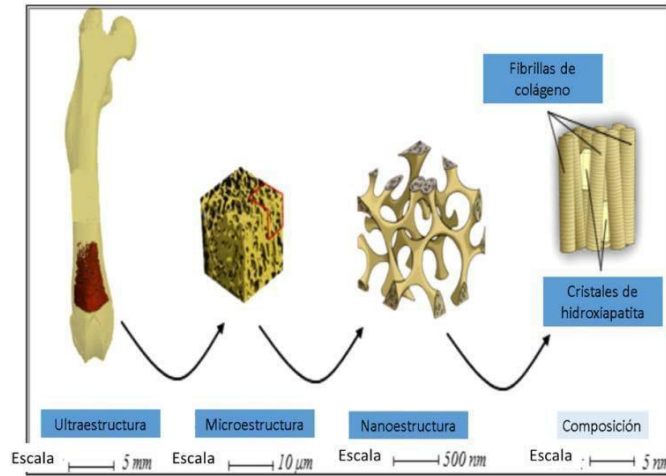


Figura 2. Composición estructural del hueso. Tomado de [3] y modificado a español

Se disponen tridimensionalmente de forma que las fuerzas aplicadas al esqueleto se distribuyan adecuadamente sin sobrecarga en las articulaciones. A nivel de superficie, es importante notar que las células se enfrentan a condiciones nanométricas lo que sugiere que estas dimensiones son críticas en el comportamiento celular. Estas condiciones estructurales, de disposición jerárquica y de dimensiones nanométricas (Figura 2 y 3) son las que se intentan recrear en el acercamiento biomimético que propone este trabajo de sustitutos óseos.



Figura 3. Organización jerárquica del hueso. Tomado y modificado de [4]

## 1.1 Componente celular

- Osteoblastos: células mononucleares, especializadas y parcialmente diferenciadas provenientes de células mesenquimales. Se caracterizan por un gran retículo endoplásmico y aparato de Golgi lo que está acorde con su función secretora. Son reclutadas en el proceso de remodelado óseo y secretan matriz hasta quedar atrapados en sus lagunas como osteocitos. También tienen acción moduladora sobre otros osteoblastos y sobre los osteoclastos [5][6].
- Osteoclastos: dos importantes procesos tienen a los osteoclastos como protagonistas, el modelado óseo que se da principalmente en las etapas de crecimiento y en ella, la estructura ósea cambia de forma en la medida en que la aposición se da en una zona diferente a la resorción y el remodelado óseo, donde no hay cambio en forma o tamaño puesto que la resorción y la aposición se dan en la misma zona [7].
- Osteocitos: una vez el osteoblasto genera suficiente matriz ósea circundante queda atrapado en lagunas calcificadas manteniendo, sin embargo, una comunicación entre ellas a través de pequeños canalículos y extensiones citoplasmáticas de los osteoblastos atrapados. Los osteocitos así atrapados, se consideran mecanosensores que son capaces de "sentir" la necesidad de aposición o resorción y activar osteoblastos u osteoclastos según la necesidad. Constituyen el 95 % de la población celular del hueso humano [3]. Dichas células pueden observarse en la Figura 4.

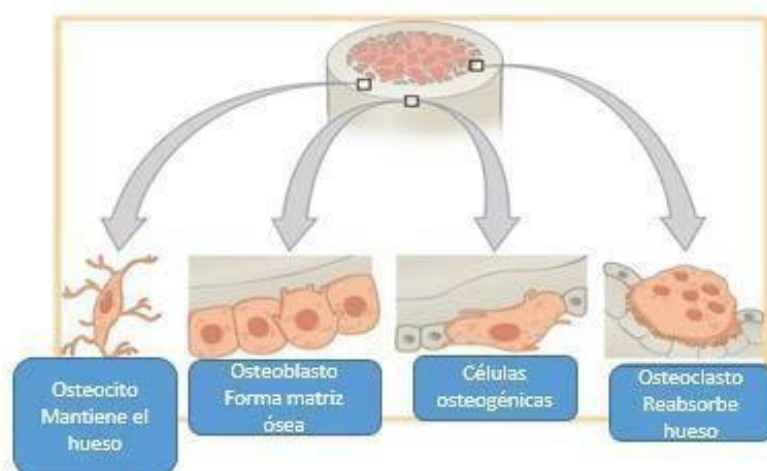


Figura 4. Células, ubicación y función. Tomado y modificado de [4]

Estas tres principales células en el metabolismo óseo (osteoblastos, osteoclastos, osteocitos) tienen funciones específicas en el proceso de resorción ósea que dura de 2 a 3 semanas y la aposición ósea que demora aproximadamente 3 meses [8]. De hecho, de acuerdo a las investigaciones más recientes, se considera al osteocito como el principal actor en la remodelación ósea [9].

## 1.2 Matriz celular

El componente más importante de la matriz ósea son las proteínas que junto con el agua y el componente celular forman el osteoide que apoya principalmente la deformación plástica del hueso.

Además del componente proteico, la matriz ósea tiene una fase mineral que consta de cristales de hidroxiapatita principalmente y que aporta resistencia mecánica al complejo proteína-fase orgánica. Bala *et al* [10] por su parte, demostraron la estrecha relación entre las propiedades elásticas y la fase mineral, así como la madurez colágena con el comportamiento plástico, sin encontrar relación entre el comportamiento mecánico del hueso y el grado de cristalinidad de su fase mineral.

Son numerosos las moléculas y compuestos (Figura 5) que cumplen un papel directo o indirecto en el fenómeno de señalización de procesos como osificación, mineralización, el modelado y el remodelado óseo, se resaltan las más notorias en algunas de estas etapas.

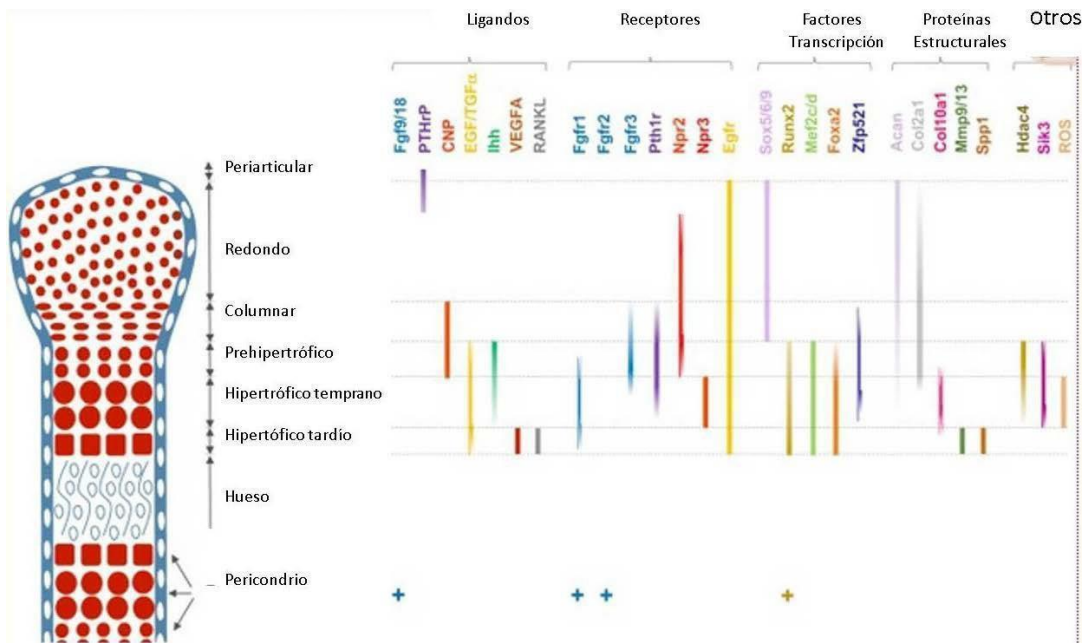


Figura 5. Resumen de las moléculas más importantes en la señalización en el proceso de formación ósea.

Tomado y modificado de Kozhemyakina *et al* [12]

Los procesos de reparación de los huesos varían según sean huesos largos o cortos y según la calidad ósea, sin embargo, los procesos fisiológicos se mantienen similares y se describen en la Figura 6.

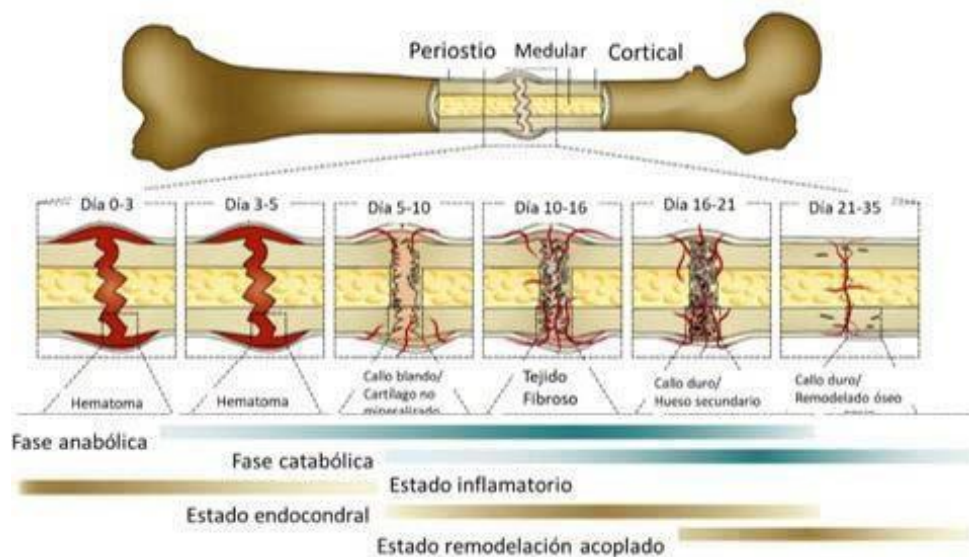


Figura 6. Resumen del proceso de cicatrización. Modificado de Wang y Yeung [13]

### 1.3 Hueso maxilar y dentoalveolar

El complejo craneomaxilar tiene varias diferencias y similitudes con los huesos del resto del cuerpo. En cuanto a los procesos fisiológicos post-maduración ósea como el recambio óseo fisiológico y la homeostasis basal, no difiere del resto de huesos, sin embargo, en el proceso embriológico y de mineralización temprana existen grandes diferencias incluso en huesos tan cercanos como la mandíbula y el maxilar superior. El esqueleto de la cabeza puede dividirse en la porción craneana, el hueso maxilar y el mandibular. Los dos primeros sufren una osificación intramembranosa y el tercero endocondral. Dicho esqueleto está recubierto internamente por las membranas duramadre y el periostio que dan protección y son fuentes potenciales de osteogénesis. [14]

En la porción craneana se incluyen los huesos que conforman las órbitas y los procesos cigomáticos que componen el malar. Se diferencia claramente el hueso basal en cada maxilar, compuesto de hueso esponjoso y cortical en diferentes proporciones; siendo más cortical y menos medular en la mandíbula y viceversa. Los huesos que conforman la bóveda craneana, los procesos cigomáticos y fronto nasal, tienen desarrollos embriológicos similares y de osificación intramembranosa; sufren remodelado óseo continuo como proceso de renovación al igual que en todo el esqueleto (aposisión y resorción osteoblástica-osteoclástica y sus mediadores) sin embargo, las diferencias locales en la disposición de hueso medular y cortical en cada estructura, hacen que sus procesos biológicos de remodelado y cicatrización difieran ligeramente.



Los huesos propiamente del cráneo son planos y están formados por poco contenido esponjoso y dos corticales densas. A medida que se acerca al hueso maxilar superior, aumenta el tejido esponjoso especialmente en la premaxila. El tejido óseo mandibular es más denso y de carácter cortical que el encontrado en el maxilar superior. Debe hacerse una consideración aparte acerca de los procesos alveolares donde se desarrollan los dientes en la infancia y se albergan una vez erupcionados durante toda la edad adulta. El hueso alveolar, junto con el cemento y el ligamento constituyen el mencionado proceso alveolar que cumple funciones de protección y nutrición de los dientes naturales. La categorización según la proporción de hueso esponjoso y cortical en cada sector de los maxilares es muy valiosa para analizar los fenómenos que se dan en cada zona anatómica de maxilar y mandíbula. Como lo resalta Moya-Villaescusa *et al* [15], Lekholm y Zarb en 1985 clasificaron el hueso de los maxilares en lo que denominaron una clasificación por calidad de hueso, que en realidad describe cuatro posibilidades de encontrar composiciones de hueso trabecular y cortical así (Figura 7):

Tipo 1 Hueso principalmente cortical denso

Tipo 2 Cortical gruesa y medular denso

Tipo 3 Cortical delgada y medular denso

Tipo 4 Hueso principalmente esponjoso, poros amplios y cortical muy delgada

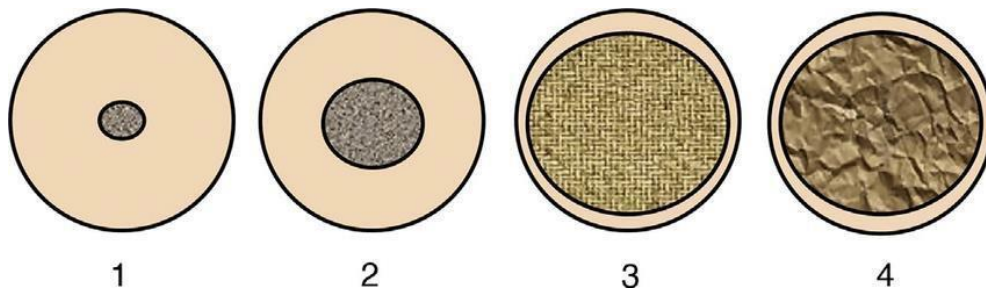


Figura 7. Esquematación de las calidades óseas según Lekholm y Zarb. Tomado de [15]

Esta clasificación descriptiva, combinada con la correlación descrita por Ribeiro-Rotta [16] y Bergkvist [17] en la cual estaría bien correlacionada con la calidad del reborde residual con el contenido mineral [18] y junto con las unidades Hounsfield (HU) arrojadas como sistema de medidas de densidad en cualquier equipo tomográfico, orientan múltiples decisiones clínicas. Al implantólogo Carl Mish, se le reconoce su aporte en este campo con la clasificación de la densidad del tejido medular así [19]:

D1: > 1250 HU

D2: 850 to 1250 HU

D3: 350 to 850 HU

D4: 150 to 350 HU

D5: < 150 HU

Una vez se pierden los dientes por trauma o enfermedad, el proceso alveolar debe remodelarse y si es implantado con un reemplazo radicular tipo implante de titanio comercialmente puro, la pérdida ósea es menor pero aún se da y debe oseointegrarse. El hueso alveolar propiamente dicho está constituido de hueso fascicular donde se insertan las fibras de Sharpey y hueso laminar conformando el saco alveolar. Como ya se ha visto experimental y clínicamente, el destino del proceso alveolar una vez pierde el diente que sustenta, es desaparecer y la pérdida marcada e inevitable de la pared vestibular constituye uno de los problemas estéticos y complicaciones de la implantología contemporánea [19] [20].

El proceso biológico de contracción y cicatrización alveolar que se inicia indefectiblemente en todo sitio de extracción dentaria presenta dos etapas, una en la que el hueso fascicular se convierte en reticular el alvéolo disminuye en altura y la segunda en la que se da una disminución en espesor horizontal y continúa la disminución en altura. La pérdida ósea neta en alvéolos con dentición vecina se desarrolla de manera centrípeta por la mayor reabsorción de la pared vestibular [21]. Cuando la pérdida ósea es generalizada, se pierden todos los procesos alveolares y se da también un remodelado de los huesos basales con una tendencia centrípeta en maxilar superior y centrífuga en el inferior (Figura 8).



Figura 8. Fotografía de maxilar superior y dentición 13 a 25 en sus procesos alveolares. Se observa el inicio del complejo fronto nasal y las paredes vestibulares con fenestraciones profundas y estrechas. Tomada del artículo de Miron Nevins sobre el destino de la pared vestibular [22]

#### **1.4 Enfermedades sistémicas y compromiso óseo**

Enfermedades tan raras como mutaciones que afectan la codificación genética para algunas citoquinas, causan desregulación de la hormona tiroidea o desbalance de Ca y están asociadas a enfermedades del sistema óseo, pero lo realmente preocupante y sorprendente es la capacidad de alteración del metabolismo óseo que pueden causar enfermedades tan comunes como la periodontitis, la diabetes, la osteoporosis e incluso condiciones no consideradas del todo como patológicas como el consumo crónico y pesado (más de 10 /día) de cigarrillo y la menopausia; pueden crear alteraciones o predisposiciones importantes en la terapia médica y odontológica. Otras complicaciones contemporáneas con respecto al metabolismo óseo y que son materia de investigación creciente es el papel que juegan los medicamentos del grupo bifosfonatos [23].

Chen y colaboradores [24] en su investigación sobre la reparación del proceso alveolar en pacientes con osteoporosis u osteopenia respaldan la hipótesis de trabajo, en la cual se plantea que un sustituto óseo con hidroxiapatita-carragenano-doxiciclina HAp-CRG-Dox, es necesario y un buen desarrollo científico para pacientes con enfermedades que básicamente se desarrollan por una alteración severa de los procesos naturales de homeostasis propia del cuerpo humano como ocurre en la osteopenia y osteoporosis. Estos autores demuestran en pruebas en animales de laboratorios cómo fenotipos osteoporóticos retrasan la cicatrización ósea del proceso alveolar.

## Capítulo 2. Biomateriales e ingeniería de tejidos

### 2.1 Introducción

Biomaterial, según la definición más aceptada y adoptada por el instituto de salud americano es: “cualquier sustancia o combinación de sustancias, diferente a los medicamentos, de origen sintético o natural, que puede ser usado por cualquier periodo de tiempo; el cual aumenta o reemplaza parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, con el fin de mantener o mejorar la calidad de vida del individuo” [25].

La biocompatibilidad por su parte se define como el conjunto de propiedades que debe tener cualquier biomaterial cuando es implantado en los tejidos vivos. “Representa la habilidad del material de coexistir en contacto con los tejidos sin causar efectos deletéreos que podrían comprometer la salud y función de los tejidos” [26].

Todo material implantado en el cuerpo humano genera una reacción instantánea que se inicia en la superficie y continúa durante todo el tiempo que el material permanezca implantado. Las primeras biomoléculas que llegan a la superficie por difusión o convección del material son las proteínas del suero (aproximadamente unas 700 proteínas en concentración de 7 g/dL). Las proteínas tipo trombina que tienen bajo peso molecular llegan primero y así sucesivamente hasta que llegan a estar en contacto con el material, proteínas tan grandes y significativas como las inmunoglobulinas con tamaños alrededor de 160 KDa [27]. El tejido humano nativo presenta información biológica, bioquímica, estructural y mecánica para inspirar el diseño de futuros materiales y hay un gran interés en separar la matriz extracelular en dominios funcionales simplificados o ensamblajes biopoliméricos de manera que se puedan manipular y ensamblar para la producción de bio-andamios y nuevos materiales biomiméticos.

Aunque se han hecho grandes avances en la investigación de ingeniería de tejidos para crear herramientas clínicas válidas, muchos constructos fallan en parte, porque falta comprensión de cómo se articulan sus contrapartes nativas o cómo funcionan los mecanismos adaptativos. Independientemente de si se crean nuevos tejidos *in vitro* idénticos a sus contrapartes naturales o se induzca la regeneración de tejido *in situ*, se necesitan matrices de soporte biodegradables temporales con similitud estructural y funcional con el tejido a reemplazar. Por lo tanto, la tendencia actual en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa es más que hacer grandes constructos *ex vivo*, enfocar los esfuerzos en crear materiales que imiten la matriz extracelular ECM o modulen los nichos de células pluripotenciales, que recapitulen interacciones esenciales con las células del huésped para desbloquear la propia capacidad y habilidad regenerativa del paciente para una autoreparación.

La tendencia es a desarrollar una armoniosa combinación de un andamio, células objetivo adecuadas y factores bioactivos estimulantes del crecimiento para promover la regeneración de los tejidos dañados o reemplazar órganos deteriorados o perdidos.

Los andamios proveen una matriz 3D que replica tanto como sea posible el nicho de las células objetivo, definiendo un nicho artificial con regulación compleja y dinámica en el cual se pueda formar el órgano. Idealmente, un andamio sirve como una estructura transitoria que, luego de un periodo más o menos extendido, sea degradado o reabsorbido en una manera controlada de acuerdo a la tasa de crecimiento del nuevo tejido. Como perspectiva futura, en el campo de la ingeniería de tejidos, se está en el punto de intentar superar los obstáculos biológicos (poco entendimiento de los mecanismos completos y complejos), técnicos (expansión a gran escala de células madre) y regulatorios (seguridad y costos).

## **2.2 Antecedentes en ortopedia y odontología**

La reacción del cuerpo a los biomateriales tanto en odontología como en ortopedia, se desarrolla básicamente a partir de un procedimiento quirúrgico que cualquiera sea su magnitud es considerado una injuria. A continuación, el material interacciona con los componentes de la sangre, principalmente proteínas plasmáticas, se forma una matriz provisional en torno al material (fibrina, células inflamatorias y epiteliales), luego se presenta una inflamación aguda y crónica, lo que desarrolla un tejido de granulación y una reacción de cuerpo extraño. En un paciente por lo demás sano, la perturbación de la homeostasis que genera el material, desata la cascada de curación fisiológica (inflamación, seguida de proliferación y finaliza en un periodo de maduración) [28].

Los reemplazos óseos en ortopedia, se consideran dentro de tres categorías o generaciones [29]:

- Primera generación: en los primeros años del siglo XX, usaban los mismos materiales que en la industria, primero el acero inoxidable, seguido por el titanio y el NiTi (Níquel-Titanio) dentro de los metales. En el campo de los cerámicos, alúmina, circonita y varios materiales porosos y en el campo de los polímeros, se destacan los poliuretanos y el polimetilmetacrilato PMMA, entre otros. En esta generación los biomateriales eran básicamente inertes.
- Segunda generación: materiales considerados bioactivos y biodegradables. En los años 1980 a 2000, los materiales cerámicos ganaban más campo dentro de los biomateriales relegando un poco los metales, resaltando en los primeros a los fosfatos de calcio y biovidrios y en los segundos metales modificados para generar bioactividad. En esta segunda generación abundan los polímeros con degradación controlable como

ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y policaprolactona (PCL), entre otros.

- Tercera generación: en la cual se busca que el biomaterial no sólo sea tolerado si no que induzca una reacción favorable del organismo. En el caso de materiales óseos se busca que sea osteoinductor y osteogénico, como es el caso de los sustitutos óseos inyectables.

### **2.3 Sustitutos óseos**

Como se describió en la introducción, la alta demanda de sustitutos óseos, cualquiera sea la causa de la pérdida, ha hecho que se desarrollen diferentes alternativas de reemplazo sin que se haya logrado a la fecha uno ideal u óptimo.

Existen varios tipos de injertos [30] y sustitutos óseos, cuya diferencia radica especialmente en la fuente de obtención, los tipos son enunciados a continuación y en la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de cada uno.

- Autoinjerto: también llamado hueso autógeno o autólogo. Es el propio tejido óseo tomado del paciente de un área cercana o distante al lecho quirúrgico. Contiene todas las células, factores de señalización y soporte del hueso por lo cual se considera osteoconductor y osteoinductor. Es ventajoso en la medida en que se evitan rechazos por el sistema inmune y es completamente vital. Presenta desventajas como la necesidad de un sitio quirúrgico adicional (en ocasiones varias) y la cantidad de injerto que puede tomarse para un caso dado. Es, sin embargo, el estándar contra el cual se evalúan y comparan los demás injertos.

En ortopedia, los sitios donantes frecuentes son cresta iliaca, radio y cúbito, en cirugía maxilofacial y rehabilitación oral es frecuente tomar hueso de cresta iliaca, calota, ángulo y sínfisis mandibular. El hueso cancelar es considerado osteogénico, osteoinductor y osteoconductor, pero con mala resistencia mecánica inicial; el hueso cortical da un mayor soporte, se considera osteoinductor y osteoconductor, pero sufre mayor reabsorción. Dentro de esta categoría se cuenta también el aspirado de medula ósea que provee osteogénesis y osteoinducción y cuando se combina con alguna matriz, es osteoconductor de manera adicional.

- Alonjerto: también denominado injerto alogénico, hace relación al hueso de origen humano tomado de otro donante diferente al intervenido. El origen es de cadáver humano. Se considera básicamente osteoconductor, algunos pueden tener capacidad osteoinductiva, dependiendo de la viabilidad remanente luego de procedimientos de esterilización y secado. Su principal indicación es para sitios en los que se necesitan más cantidades de injerto que lo que pudiera lograrse por vía autógena; sin embargo, hay riesgo de rechazo antigénico y contaminación. Los más usados dentro de este grupo son la matriz ósea con y sin minerales. Se usa sola o mezclada con autoinjerto para aunar las propiedades osteoconductoras e inductoras con el potencial osteogénico del hueso medular propio del paciente, por ejemplo.
- Xenoinjerto: tejido óseo tomado de mamíferos tipo bovino, murino, equino, porcino que conserva la estructura similar al hueso humano, sin embargo, no inducen la formación de hueso si no que sirven de esqueleto para la formación ósea. También se conoce como injerto heterólogo o sustituto óseo de origen animal. En este grupo se destaca el uso de exoesqueleto de coral.
- Aloplásticos: material de origen no óseo natural o sintético que intenta imitar el hueso natural. No proviene de donante vivo humano o animal.

En el campo de la ingeniería de tejidos, particularmente para reemplazos o sustitutos óseos, es importante conocer las propiedades que tiene el hueso natural al cual se debe imitar y cuáles son las propiedades o características que debe buscar en forma ideal un material que pretenda ser el reemplazo biológico de estas estructuras del sistema óseo. Estas propiedades se describen a continuación:

-Osteogénesis: capacidad de producir hueso por sí mismo, debe contener células osteoprogenitoras.

-Osteoinducción: capacidad de inducir o incitar a la producción de hueso, requiere diversos factores de señalización que diferencien células del huésped. Las proteínas con acción mitogénica en células indiferenciadas tienen un papel fundamental en esta capacidad, en especial la superfamilia TGF- $\beta$ . El parámetro que establece si un material es osteoinductivo es que sea capaz de formar hueso ectópico o heterotópico.

-Osteoconducción: capacidad de actuar como una matriz a través de la cual penetren capilares y células de linaje osteoblástico o con capacidad de diferenciarse y producir hueso a partir de ese soporte. Una matriz osteoconductoras actúa como un andamio de soporte para el ingreso de nuevo hueso.

-Osteopromoción: capacidad de promover la formación de hueso en un sitio dado a partir de la inhibición de migración temprana de otras células tipo células epiteliales y fibroblastos gingivales.

Tabla 1. Clasificación de los injertos para reemplazo óseo

Tipo Material	Subtipo		
<b>1. Autoinjerto</b>	1.1 Hueso cortical vascularizado y no vascularizado		
	1.2 Hueso medular		
	1.3 Hueso córtico-medular		
	1.4 Médula ósea		
<b>2. Aloinjertos</b>	2.1 Cortical		
	2.2 Medular		
	2.3 Córtico-medular		
	2.4 Matriz ósea mineralizada y desmineralizada		
<b>3. Xenoinjertos</b>	3.1 Bovino		
	3.2 Equino		
	3.3 Porcino		
<b>4. Aloplásticos</b>	4.1 Cerámicos	4.1.1 Fosfofálticas	• HAp, c-HA
			• Fosfato bicáltico
			• Fosfato tricáltico
			• Fosfatos de calcio bifásicos
		4.1.2 Sulfatos de Ca	
		4.1.3 Biovidrios	
		4.1.4 Otros: Alúmina	
	4.2 Polímeros	4.2.1 Naturales	• Proteínas: ejemplo: fibroína
			• Polisacáridos: ejemplo: carragenano
			• Poliésteres: ejemplo: polihidroxicanoatos
			• Poliamidas: ejemplo: nylon
		4.2.2 Sintéticos: PGA,PLA,PCL,PLGA	
	4.3 Metálticos : Ti, Ta, Al		
	4.4 Compuestos: combinaciones de los anteriores: $\beta$ -TCP + Médula ósea [13]; bifásico+Gentamicina+autógeno		
	4.5 Biocompuestos: andamios + células mesenquimales, factores de crecimiento [31]		



Algunas técnicas modernas incluyen el uso de fresas con estrías que acumulan el hueso en la medida en que se prepara el lecho óseo. Esta técnica reduce la desventaja del hueso autólogo en el sentido de no necesitar un segundo sitio quirúrgico. Sin embargo, la cantidad de hueso obtenido sigue siendo una limitación. Otra técnica de reemplazo óseo como la que propuso Ilizarov en 1951, logra formación de hueso entre dos fragmentos al separarlos con distractores que aprovechan la tensión del periostio que permanece intacto (distracción osteogénica).

Dentro de los sustitutos óseos, es de particular importancia el campo de los inyectables que ha aumentado significativamente en los últimos 20 años, los cuales permiten inyectar material en defectos óseos de tamaño crítico con la forma exacta del mismo sin desperdicio de materiales y sin dejar vacíos entre hueso nativo y sustituto, que ocasionan espacios muertos propensos al atrapamiento de coágulos sanguíneos sin irrigación vascular; lo que puede producir focos de infección ya sea por anacoressis o contaminación directa en el proceso quirúrgico. El material inyectable debe tener una consistencia de fácil aplicación bajo una fuerza moderada de inyección con la posición tipo apretamiento (pinch) de la mano del cirujano (Figura 9), tal fuerza de aplicación varía si el agarre es del tipo palmar o a dos manos. La fuerza ejercida con estos agarres es en promedio entre 71,1 N para la posición B hasta 104,7 N [32].

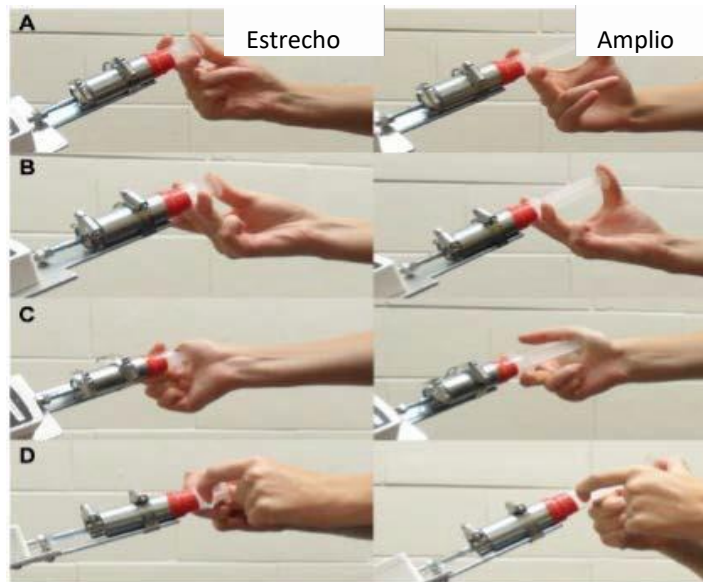


Figura 9. Tipos de agarre de jeringas quirúrgicas. A. Tipo disparo B. Disparo modificado C. Tenar D. Dos manos.

Modificado de [32]

## Capítulo 3. Polímeros naturales

### 3.1 Clasificación y uso en ingeniería de tejidos

Los biopolímeros se clasifican en naturales y sintéticos (Tabla 2). A su vez se diferencian en su forma de degradación, siendo predominante el metabolismo enzimático en los naturales y proceso hidrolítico en los artificiales. De acuerdo a Hayashi [33] deben poseer las siguientes propiedades ideales para su uso biomédico:

1. El polímero y sus subproductos no deben inducir respuesta del sistema inmune o toxicidad tisular.
2. La tasa de degradación y absorción debe poder ser establecida y estar acompañada con la cicatrización y reparación ósea.
3. Facilidad y diversidad de métodos de procesamiento.
4. Buenas propiedades mecánicas.

Tabla 2. Polímeros de uso en ingeniería de tejidos [34]

Tipo de polímero	
1. Sintéticos	2. Naturales
<u>Ventajas:</u> posibilidad de ajustes en propiedades físicas, químicas y mecánicas, no es inmunogénico y no hay transmisión de enfermedades.	<u>Ventajas:</u> baja toxicidad, bajo costo, señalización celular, renovable, degradación mediada por células.
<u>Desventajas:</u> falta de señales biológicas.	<u>Desventajas:</u> baja estabilidad mecánica, química y térmica, riesgo inmunogenicidad y transmisión de enfermedades, riesgo de pérdida de propiedades biológicas durante el procesamiento.
1.1 Poliésteres alifáticos saturados de cadena corta	2.1 Colágeno y ácido hialurónico
1.2 Policaprolactona (PCL)	2.2 Fibroína
1.3 Poliuretano reabsorbible	2.3 Alginatos
1.4 Fumarato de propileno	2.4 Polihidroxicanoatos
1.5 Polifosfazanos y poli 1,4 succinato de butileno	2.5 Almidones, celulosas y dextranos

El uso de polímeros naturales en ingeniería de tejidos ofrece las siguientes ventajas estratégicas [35]:

1. Similitud con la estructura de la matriz extracelular de los tejidos a regenerar.
2. Fuentes múltiples y renovables (plantas, animales, algas y microorganismos).
3. Biodegradabilidad.
4. Biocompatibilidad.
5. Seudoplasticidad, capacidad de gelación, absorción de agua.
6. Facilidad de combinarse entre polímeros y con otros compuestos.
7. Grupos químicos funcionales disponibles como aminos, carboxílicos e hidroxilos para reacciones hidrólisis, oxidación, reducción, esterificación, entrecruzamientos y reacciones enzimáticas.
8. El polímero les aporta resistencia, plasticidad y rigidez a los materiales compuestos. Mejora las deficiencias mecánicas atribuidas a los materiales de fosfato de calcio cuando se usa solo (baja resistencia a la tensión).
9. Suavidad y ductilidad: aporta facilidad de conformación [36].

Como desventajas se les atribuye:

1. Diferencias entre lotes de producción.
2. Reacciones inmunes a la presencia de toxinas y contaminantes.
3. Con frecuencia requieren asociaciones con otros materiales para aumentar su resistencia mecánica inicial, lo que aumenta los costos.

En la tabla 3 se señalan los polímeros naturales usados hasta el momento como biomateriales.

Tabla 3. Clasificación de los polímeros naturales usados en ingeniería de tejidos [37]

Origen-Grupo	Proteínas	Polisacáridos	Poliésteres	Poliamidas
<b>Vegetal</b>	○ Soya	○ Almidón ○ Celulosa ○ Arabinogalactano ○ Fibroína		
<b>Animal</b>	○ Colágeno de mamíferos y animales marinos	○ Quitina ○ Quitosano ○ Ácido hialurónico		
<b>Bacteriano</b>		○ Dextrano ○ Goma gellan ○ Xantano ○ Ácido algínico*	○ Polihidroxialcanoatos	○ Poli glutamato ○ ε-polilisina ○ Cianoficina
<b>Algas</b>		○ Alginatos* ○ Agarosa ○ Carragenano		
<b>Hongos</b>		○ Pululano ○ Quitina ○ Quitosano		
*Alginatos y ácido algínico se han obtenido de algas y bacterias tanto de forma natural como por medios biotecnológicos.				

Existe una tendencia reciente al uso de los polímeros de origen natural. En el campo de los biomateriales, los polímeros han superado a los polipéptidos y a los ácidos nucleicos en el porte de medicamentos por presentar mejores condiciones de vida media como vehículo.

Los polímeros por su parte, atrapan el medicamento y sufren una degradación heterogénea más apropiada para porte de medicamentos y otros elementos. Dentro de los polímeros naturales, se destacan los de origen en las algas, su nombre común es polisacáridos derivados de macro algas, se clasifican por su coloración y tienen un gran mercado en el campo alimentario, en la industria farmacéutica y en materiales de impresión para odontología. Dicho mercado está dominado en un 50 % por China, según reporta la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, siglas en inglés) en 2016.

Algunos polímeros naturales como el quitosano se han estudiado como sustituto óseo debido a sus propiedades como la poca reacción inmunogénica, antibacterial, biocompatible y biodegradable. Como sustituto óseo se ha investigado en combinación con HAp, nanotubos de carbono y otros polímeros [38] [39] [40] [41]. También está la fibroína de seda que es una proteína que se obtiene de los capullos del gusano *Bombyx mori*, es un promisorio material con propiedades mecánicas sobresalientes y con posibilidad de fabricarse en diferentes formas, apoya la diferenciación de células mesenquimales en células del linaje osteoblástico [42] entre muchas aplicaciones, es

importante resaltar que se han investigado como sustitutos óseos en mezcla con polifosfatos y nanohidroxiapatita [43] [44] o en combinaciones con otros polímeros [45]. Dentro de los objetivos de este trabajo se busca trabajar con el carragenano, del cual no se encuentra mucha literatura como parte de un sustituto óseo, a excepción de los trabajos realizados por González [46].

### 3.2 Carragenano

En el campo de la biotecnología marina, el carragenano ocupa un importante lugar debido a sus aplicaciones en la industria alimentaria, así como en el campo de la regeneración de tejidos y como de vehículo para medicamentos. Sus propiedades principales son atribuibles a su fuerte carga negativa y capacidad de gelación [47]. Desde 1966 hasta 2010 se han patentado alrededor de 22 desarrollos con carragenano desde métodos de extracción hasta pastas dentales.

Deriva su nombre de la palabra *carrageen* = pequeña roca (irlandés colonial). En 1862 Stanford acuña la palabra carragenina (carrageenin) que con los años se ha modificado a carragenano (carrageenan) haciendo uso desufijo “an” usado para materiales del grupo de los polisacáridos [48]. Las propiedades físicas del carragenano se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades físicas del carragenano. Tomada de fisheries FAO para fines educativos [48]

Característica	Manifestación
<b>Solubilidad</b>	5mg/mL en agua a 80 °C
<b>Insolubilidad</b>	Solventes orgánicos, mezclas oleosas
<b>Punto gelación</b>	30 a 50 °C
<b>Punto fusión</b>	50 a 70 °C
<b>Resistencia del gel</b>	100-350 g/cm <sup>2</sup>
<b>Viscosidad</b>	30-300 cp
<b>Presentación</b>	Polvo ligeramente amarillento o crema
<b>Aplicaciones</b>	Alimentos y bebidas, industrial, farmacológico
<b>Biocompatibilidad</b>	Buena
<b>Viscoelasticidad</b>	Gel desde 1,5 %

De las macro algas rojas se obtienen 6 tipos de carragenano ( $\lambda$ ,  $k$ ,  $v$ ,  $\theta$ ,  $\iota$ ,  $\mu$ ) de los cuales  $\mu$  (mi) y  $v$  (ni), son precursores de  $k$ -carragenano y  $\iota$ -carragenano que son los principales productos comerciales por su capacidad de formar geles. También se encuentra una formación híbrida de  $k/\iota$  (Figura 10). En términos generales, las más comerciales son kappa, lambda e iota, siendo las dos primeras buenas formadoras de geles, más o menos elásticos según el manejo con KCl y contenido de sulfatos. Los geles se forman más fácilmente con sales de potasio y en segundo lugar con calcio en los carragenanos kappa y lo contrario se observa en las especies iota [49]; en términos generales la especie lambda es no gelificante, sin embargo, hay avances recientes en este aspecto.

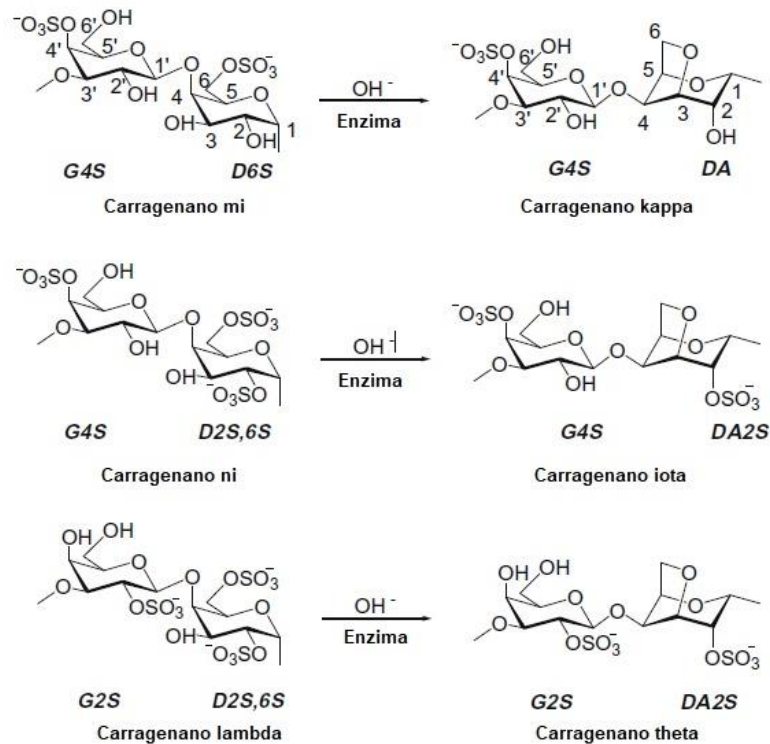


Figura 10. Tipos de Carragenano. Pertenecientes a la familia de galactanos sulfatados lineares hidrofílicos.

Modificado de Campo *et al* [50]

Entre las algas rojas que dan origen al carragenano, el género *Chondrus crispus* fue el inicial, pero ahora se usa y se cultiva más el género *Eucheuma*; *Eucheuma cottonii* (*Kappaphycus alvarezii*), Figura 11, y *Eucheuma spinosum* (*Eucheuma denticulatum*). Los países como Indonesia, Japón, China y Filipinas fueron los pioneros, pero el mercado hoy está en muchos países occidentales, siendo Chile una potencia en el mercado de los carraginofitos no cultivados.



Figura 11. *Kappaphycus alvarezii* húmeda y seca. Tomada de fisheries FAO para fines educativos [48]

A pesar de las variadas aplicaciones en el campo alimentario, cosmético, excipiente de farmacia por sus propiedades ya descritas, éste texto se direccionará a informar los antecedentes de aplicaciones en el campo biotecnológico y de los biomateriales.

## Capítulo 4. Fosfatos de calcio

### 4.1 Bioapatitas

El nombre apatita, acuñado desde 1788 por Werner, agrupa minerales diferentes que comparten la fórmula  $M_{10}(PO_4)_6X_2$  en donde M es con frecuencia Ca y X puede ser OH (el más común), Flúor o Cloro, en la Tabla 5 se resumen los principales componentes de este grupo.

Las apatitas biológicas (fase inorgánica o componente mineral de huesos y dientes), constituyen el mineral más abundante en los seres vivos. Hacen parte del esqueleto de mamíferos y de los caparazones de crustáceos. Se originan de fosfatos de calcio amorfo que se convierte apatita carbonatada nanocrystalina (25 a 50 nm) deficiente en Ca, poco cristalina (a diferencia de la apatita mineral) que pasa por un proceso de biomineralización de tipo nuclear y forma junto con el componente orgánico, una estructura jerárquica muy resistente, de porosidad micrométrica interconectada [51]. Entre las apatitas biológicas se cuenta el hueso humano procesado, el hueso bovino y el derivado de coral o algas convertido por procesos hidrotérmicos. En las sintéticas, resaltan la hidroxiapatita, fosfatos bi y trifásicos, hidroxiapatita deficiente en Ca, entre otras.

### 4.2 Apatitas sintéticas

En el campo de las apatitas sintéticas es frecuente encontrar diferentes elementos sustituyendo las posiciones de Ca y P, lo que da como resultado diversas estructuras con variantes en vacancias y en grado de cristalinidad, pero en teoría biocompatibles [54]. A mayor grado de cristalinidad, menor su grado de reabsorción en fluidos biológicos. La similitud química y estructural de la hidroxiapatita con el mineral del hueso sugiere una biocompatibilidad intrínseca actuando como promotora del crecimiento óseo.

La HAp sintética puede obtenerse por: reacción de estado sólido, sol gel, microondas, precipitación o hidrólisis junto con sinterización a 1.000 °C, la derivada de coral se obtiene por reacción hidrotérmica de  $CaCO_3$  con fosfato de amonio. La HAp de origen bovino para uso en biomateriales se obtiene retirando la fase orgánica y subsecuente sinterización en algunos casos. Los distintos procesos y orígenes se traducen en diferentes tamaños de cristal y comportamiento cristalino, en consecuencia, la tasa de reabsorción varía así de mayor a menor:



Tabla 5. Ortofosfatos. Elaborada con base en [52] [53]

Compuesto	Fórmula	Radio Ca/P	Solubilidad a 25 °C		Estabilidad pH
			-log k	g l <sup>-1</sup>	
4.2 Fosfato monocalcico monohidrato (MCPM)	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0,5	1,14	18	0,0-2,0
Fosfato monocalcico Anhidro (MCPA o MCP)	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,5	1,14	17	Estable sobre 100 °C
Fosfato dicalcico anhidro o monetita	CaHPO <sub>4</sub>	1,0	6,90	0,04 8	Estable sobre 100 °C
Fosfato dicalcico Dihidrato (DCPD) o Brushita	CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,0	6,59	0,08 8	2,0-2,6
Fosfato octacalcico (OCP)	Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1,33	96,9	0,00 81	5,5-7,0
Fosfato $\alpha$ tricalcico ( $\alpha$ TCP)	$\alpha$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1,50	25,5	0,00 25	----
Fosfato $\beta$ tricalcico ( $\beta$ TCP)	$\beta$ -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1,50	28,9	0,00 05	---
Fosfato de calcio amorfo (ACP)	Ca <sub>x</sub> H <sub>y</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>z</sub> · nH <sub>2</sub> O, n = 3-4.5, 15-20 % H <sub>2</sub> O	1,2-2,2	25,7- 32,7	----	5-12
Hidroxiapatita deficiente en Ca (CDHA o CdA)	Ca <sub>10-x</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>x</sub> (OH) <sub>2-x</sub> (0 < x < 1)	1,5-1,67	850	0,00 94	6,9-9,5
Hidroxiapatita (HA, HAp o HAP)	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	1,67	117	0,00 02	9,5-12
Fluorapatita (FA, FAp)	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> F <sub>2</sub>	1,67	120	0,00 03	7-12
Fosfato tetracalcico (TTCP)	Ca <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O	2,0	38- 44	0,00 07	---
Hueso humano	Ca <sub>8.3</sub> [ <sub>1.7</sub> PO <sub>4</sub> ] <sub>4.3</sub> (HPO <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> ) <sub>1.7</sub> (OH, <sub>1/2</sub> CO <sub>3</sub> ) <sub>0.3</sub> [ <sub>1.7</sub>	1,55-1,75	---	---	---

La técnica combinada de precipitación/tratamiento hidrotermal permite un adecuado control del tamaño de la nanoforma obtenida a través del tamaño de la gota en el goteo y su velocidad.

Es una de las técnicas más económicas en la cual, soluciones acuosas de nitrato de calcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O) y fosfato de amonio (H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>) NH<sub>4</sub>), producen una síntesis química de hidroxiapatita sintética [55]. La obtención de partículas de tamaño nanométrico (menores a 100 nm) con esta técnica, mejora la interacción célula-biomaterial y el comportamiento de las proteínas con el mismo. Ferraz *et al* [56] señalan las siguientes acciones de las

nanopartículas de HA sobre las cerámicas convencionales.

1. Mejores propiedades físicas: tamaño de grano, tamaño de poro, humectabilidad.
2. Mayor control de las interacciones proteicas: adsorción, configuración y bioactividad.
3. Realce de la función osteoblástica: síntesis de fosfatasa alcalina y deposición de calcio.

El uso de cerámicas sintéticas tiene como finalidad producir importantes cantidades de material inorgánico evitando las reacciones inmunes adversas y la transmisión de enfermedades. Con este objetivo, los avances de las cerámicas no biológicas pueden resumirse en tres generaciones [51].

1. Cerámicas de reemplazo, inertes químicamente (1950).
2. Cerámicas bioactivas y reabsorbibles (1980).
3. Cerámicas compuestas como andamios tridimensionales con porosidad controlada interconectada.

La hidroxiapatita pura (HAp) tiene una relación estequiométrica de 1,67 Ca/P. Una estructura hexagonal típica, con una simetría de grupo  $P6_3/$  y parámetros de red  $a=b=9,432$ ,  $c=6,881 \text{ \AA}$  y  $\gamma= 120^\circ$  (Figura 12). La estructura se describe como un tetraedro de  $PO_4^{3-}$  mantenidos juntos por los grupos  $Ca^{2+}$  entre ellos [57].

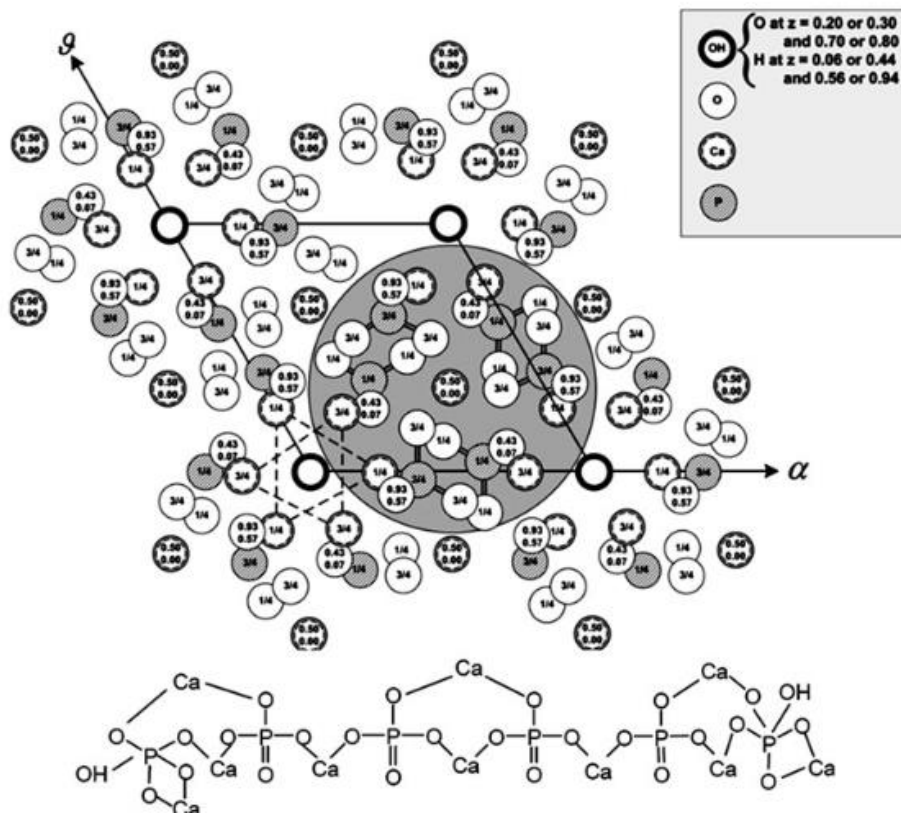


Figura 12. Celda unitaria simplificada de HA,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  [58]

## Capítulo 5. Tetraciclinas

Las tetraciclinas clásicas clortetraciclina, oxitetraciclina, demeclociclina y tetraciclina fueron descubiertas entre 1948 y 1953, han sido usadas desde entonces como antibióticos de amplio espectro gracias a la acción quelante con el ion magnesio que afecta la síntesis de proteínas atacando la subunidad ribosomal 30s. Otra forma en que las tetraciclinas afectan la supervivencia bacteriana se debe a su gran capacidad de formar complejos con diferentes iones. Las tetraciclinas también se unen al Ca, creando una inhibición competitiva por este nutriente en el medio. Posteriormente, como resultado de diversas modificaciones químicas (tetraciclinas químicamente modificadas o sustituidas) surgen las tetraciclinas semisintéticas denominadas minociclina, doxiciclina, limeciclina, rolitetraciclina, glicilciclinas. Finalmente están las tetraciclinas de tercera generación, que son totalmente sintéticas, entre ellas está la tigeciclina (consideradas por algunos como otro tipo de antibiótico llamado glicilciclinas), algunas se desarrollaron para que tengan exclusiva actividad antimetaloproteinasas (CMT1 a CMT8) [59]. Las estructuras se observan en la Figura 13.

Sin embargo, el descubrimiento de nuevos antibióticos y el aumento de la resistencia bacteriana a estos antibióticos clásicos han hecho que disminuya su uso como antibacteriano a la vez que ha aumentado su uso como no antibacteriano.

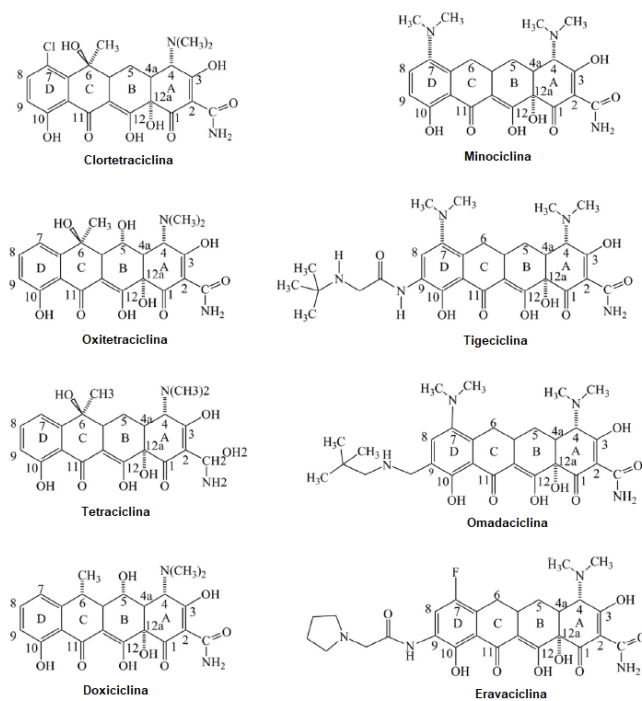


Figura 13. Estructura molecular de tetraciclinas. Tomado de [60]

En algunas tetraciclinas sintéticas inclusive se les retira su capacidad antibacteriana al retirar el grupo dimetil-amino de la posición C-4 lo que potencia sus otras acciones [61] [62] [63].

### **5.1 Actividad anticolagenolítica de las tetraciclinas**

En 1962 cuando Gross y Lapiere [64] identificaron y describieron las metaloproteinasas animales, descubiertas por la experimentación con renacuajos que pierden grandes cantidades de masa en su metamorfosis como la cola y papada, entre otros, iniciaron un camino de descubrimientos y evoluciones en el campo de las metaloproteinasas de matriz de mamíferos que continúa casi cinco décadas después. En 1983 Golub y su grupo de trabajo, basados en lo ya descrito, descubrieron de forma inesperada la inactivación que pueden ejercer los compuestos de tetraciclina sobre las metaloproteinasas.

Desde 1990 han sido patentadas las composiciones submicrobianas de las tetraciclinas (anticolagenolíticas), para el tratamiento en general de muchas enfermedades caracterizadas por la destrucción acelerada del tejido conectivo y hueso, como enfermedades periodontales, úlceras de córnea, deficiencias óseas, artritis reumatoide [65] [66], inhibición de crecimiento de células de cáncer [67] y tratamiento en esclerosis múltiple [68], entre otros.

El uso de tetra y sus efectos no antibacterianos ha sido estudiado y patentado por el mismo grupo de Stony-Brook en aplicaciones como prevención y tratamiento de caries radicular [66], tetraciclina sola o asociado con aines para disminuir la pérdida ósea [69], con bifosfonatos [70], tratamiento de enfermedades autoinmunes [71] y tratamiento de osteoporosis en humanos [72].

### **5.2 Antecedentes**

Hace aproximadamente 35 años Golub descubrió que la minociclina disminuía la acción de las colagenasas gingivales en diabetes [73]. En 1997, un estudio con ratas diabéticas inducidas con estreptozocina encontró un mantenimiento en la formación ósea, engrosamiento cortical y prevención en la pérdida de hueso cancelar al suministrar de 20 mg/día de minociclina [74] y el suministro de dosis subantimicrobianas de doxiciclina 20 mg/día disminuyeron la pérdida ósea localizada en periodontitis y sistémicas en pacientes con osteopenia [75].

En el estudio de Ohyori *et al* encontraron que la tetraciclina químicamente modificada no solo indujo formación

ósea en ratas ovariectomizadas, sino que modificó la actividad reabsortiva, observado en menores lagunas y disminución del borde ruflado de los osteoclastos [76].

Desde principios del siglo XXI, el grupo de Grabowski por su parte, ha demostrado que la acción antiresorptiva de las tetraciclinas modificadas se debe también a la actividad inhibidora de los osteoclastos e inducción a la apoptosis de los mismos como un mecanismo independiente [77][78].

Las tetraciclinas han demostrado también su efecto antiinflamatorio en enfermedades como periodontitis y enfermedad cardiovascular aterosclerótica por el mecanismo de inhibir la producción de TNF- $\beta$ , IL-6, and MCP-1, por parte de las células inflamatorias mononucleares [79], la inhibición selectiva de la IL-6 en los osteoblastos también fue comprobada en el estudio de Kirkwood y colaboradores en 2003 [80].

El Grupo de Golub, resume que las tetraciclinas incrementan la formación de hueso por los siguientes mecanismos:

1. Incrementa los niveles de mRNA procolágeno y la síntesis de colágeno [81].
2. Restaura parcialmente la actividad osteoblástica, formación de matriz y mineralización disminuida durante enfermedades como diabetes [74].
3. Incrementa el número de osteoblastos activo respecto a los inactivos [82].

Así mismo, Sousa y Fernandes en el 2007 [83] encontraron en su estudio con doxiciclina y minociclina en células de médula ósea humana que la exposición a largo plazo con estas CTs “indujo un incremento significativo en el número de células osteoblásticas activas produciendo una cantidad proporcional de matriz ósea normal”.

### **5.3 Aplicaciones en ingeniería de tejidos**

Algunas aplicaciones de estos descubrimientos científicos en el campo de la ingeniería de tejidos se encuentran en el estudio de membranas de fibroína de seda cargadas de tetraciclina al 0 %, 1 %, 5 % y 10 % [84], para evaluar la diferenciación de osteoblastos a partir de células mesenquimales derivadas de tejido gingival humano apoyando otras investigaciones de regeneración ósea guiada que soportan la combinación de andamios pro-osteoblásticos con tetraciclina [85] [86]. El estudio de Sipos *et al*, sin embargo, no mostró diferencias significativas en el uso de tetraciclinas adjunto a membranas PTFE en defectos periodontales intraóseos [87]. Las diferencias pueden estar dadas por la variación en biomateriales y en las metodologías usadas que dificulta la comparación directa.

Con biopolímeros bacterianos del tipo polihidroxicarbonato PHA se ha explorado el uso de tetraciclinas de acción antibiótica, cargando cuatro tipos de polihidroxicarbonato en microesferas con tetraciclina y comprobando su acción bactericida contra los periodontopatógenos que causan la periodontitis en humanos [88].

Por otro lado, materiales de nHA/B-TCP cargados con tetraciclina y puestos en contacto con cultivos de células mesenquimales, comprobaron el efecto antibacteriano y potencial regenerador óseo [89], como lo hiciera antes el grupo de Goodson. En el estudio de Madhumati y Kumar en 2014, nanoportadores de HA deficiente en Ca cargados con tetraciclinas, además de apoyar los resultados anteriores, demostraron crecimiento en la población de fibroblastos del ligamento periodontal [90].

Además, el uso de tetraciclinas de manera local ya sea con fines antibióticos o antiresorptivos se prefiere sobre el uso sistémico para evitar afectación sistémica colateral.

En resumen, los efectos no antibacterianos de las tetraciclinas y sus modificaciones documentados son [63] [78]:

1. Antiinflamatorios
2. Anticolagenasas y antigelatinasas (MMP)
3. Inhibición de angiogénesis
4. Antiapoptosis neuronal
5. Proapoptosis osteoclastos
6. Inhibición de osteoclastogénesis [91]
7. Pro-osteoblástica [83]

Los mecanismos que explican estos efectos son resumidos por el grupo de Golub [91] [92] [93], como sigue:

1. Inhibición de MMPs activas y colagenasas de la matriz bajo un mecanismo de unión a  $Ca^{++}Zn^{++}$ .
2. Previene conversión de procolagenasa latente/pro MMP en formas activas, función no relacionada con formación de complejos metálicos.
3. Regulación a la baja de procolagenasa/pro MMPs en un mecanismo asociado a la inhibición de mediadores proinflamatorios como (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF) y IL-6, así como fosfolipasa A2/prostaglandina E2 y sintasa inducible por óxido nítrico.

Esto genera importantes oportunidades terapéuticas en las áreas de oncología, dermatología, cardiovascular y ortopedia (tejido óseo y cartílago), odontología (periodontitis, implantología) y endocrinología (diabetes). Dentro

de las tetraciclinas con acción antimetaloproteinasas (doxiciclina, minociclina y CMT1 a 8) solo la doxiciclina ha sido aceptada por las agencias americana y europea de medicamentos. Dentro de la doxiciclina se encuentra la variedad hiclato que es altamente soluble en agua y la monohidrato que es poco soluble en agua. En odontología se comercializan muchos productos con tetraciclinas en fibras, chips, geles y tabletas (Atridox®, Arestín®, Periochip®, Periostat®), no obstante, en Colombia se consigue ninguno en el momento.

#### 5.4 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)

Pueden ser secretadas tanto por bacterias como por las propias células de mamíferos [94]. Al contrario de lo que se creía hace muchos años, las que produce el tejido propio humano destruyen más tejido conectivo que las que producen las bacterias, cambiando así el foco epidemio-patológico de la mayoría de las enfermedades al huésped en lugar de las bacterianas; determinando así que, si bien las bacterias en muchos casos son un factor indispensable para la ocurrencia de una patología, no son un factor suficiente en todos los casos [95]. Por lo tanto, el objetivo de esta revisión sobre MMPs hace referencia a las producidas por células de mamíferos y no las de origen bacteriano. Son endopeptidasas asociadas al Zn<sup>+</sup> que degradan varias proteínas de matriz y juegan importantes papeles en condiciones fisiológicas para facilitar el recambio de material orgánico, angiogénesis y desarrollo fetal, en condiciones patológicas, hacen parte de la cadena destructiva de varias enfermedades como periodontitis, artritis reumatoideas y osteoporosis, entre otras [96] [97] [98]. El mecanismo de inhibición propuesto está relacionado con la gran capacidad de formar complejos, por lo cual las tetraciclinas se unen al Mg o Ca del centro de la proteína inactivándola [99]. La Tabla 6 reporta las metaloproteinasas identificadas actualmente.

Tabla 6. Resumen de las metaloproteinasas de matriz o matrixinas [103]

Grupo MMP	Identificación
<b>Gelatinasas</b>	MMP-2, MMP-9
<b>Colagenasas</b>	MMP-1, MMP-8, MMP-13
<b>Estromelisinias</b>	MPP-3, MMP-10
<b>Matrilisinias</b>	MMP-7, MMP-26
<b>Metaloeslastasas</b>	MMP-12
<b>MMPs tipo membrana</b>	MMP14-16, MMP 23-25

Las MMPs son secretadas por células estromales (epiteliales, fibroblastos y células inflamatorias) en forma inactiva, se cree que su expresión se induce con señales de algunas citoquinas, factores de crecimiento, disturbios

en la matriz o contacto célula a célula. La activación se da mediante un mecanismo de cascada de una MMP a otra [61].

Tabla 7. Condiciones fisiológicas y patológicas en las que intervienen las MMPs [99]

<b>Fisiológicas</b>	<b>Patológicas</b>
<i>Desarrollo</i>	<i>Destrucción de tejido</i>
<b>Implantación blastocito</b>	Artritis reumatoidea
<b>Desarrollo embrionario</b>	Osteoartritis
<b>Crecimiento nervioso, óseo</b>	Invasión oncológica
<b>Remoción del plato de crecimiento de cartilago</b>	Ulceración gástrica
<b>Resorción de dientes deciduos</b>	Enfermedad periodontal
<i>Reproducción</i>	<i>Enfermedades fibróticas</i>
<b>Ciclo endometrial</b>	Cirrosis
<b>Involución uterina post-parto</b>	Enfermedad pulmonar fibrótica
<b>Involución glándula mamaria</b>	Osteo y arterioesclerosis
<i>Mantenimiento</i>	<i>Debilita matriz</i>
<b>Remodelado óseo</b>	Cardiomiopatía dilatada
<b>Curación de heridas</b>	Aneurisma aórtico
<b>Angiogénesis</b>	Epidermólisis bullosa

Algunos autores denominan estas enzimas como matrixinas o endopeptidasas por la función ya descrita y se reportan alrededor de 23 familias de ellas que se diferencian en el sustrato proteico en el cual actúan. La importancia de las MMPs se hace latente cuando se observa que estas enzimas participan en procesos fisiológicos como embriogénesis y remodelación tisular (hueso entre ellos) pero también son determinantes etiológicos en enfermedades como ateromas, artritis [101], cáncer [102], enfermedades neurodegenerativas [103] y ulceraciones tisulares, entre otros. La Figura 14 resume la configuración básica de las MMPS según Visse y Nagase[103].



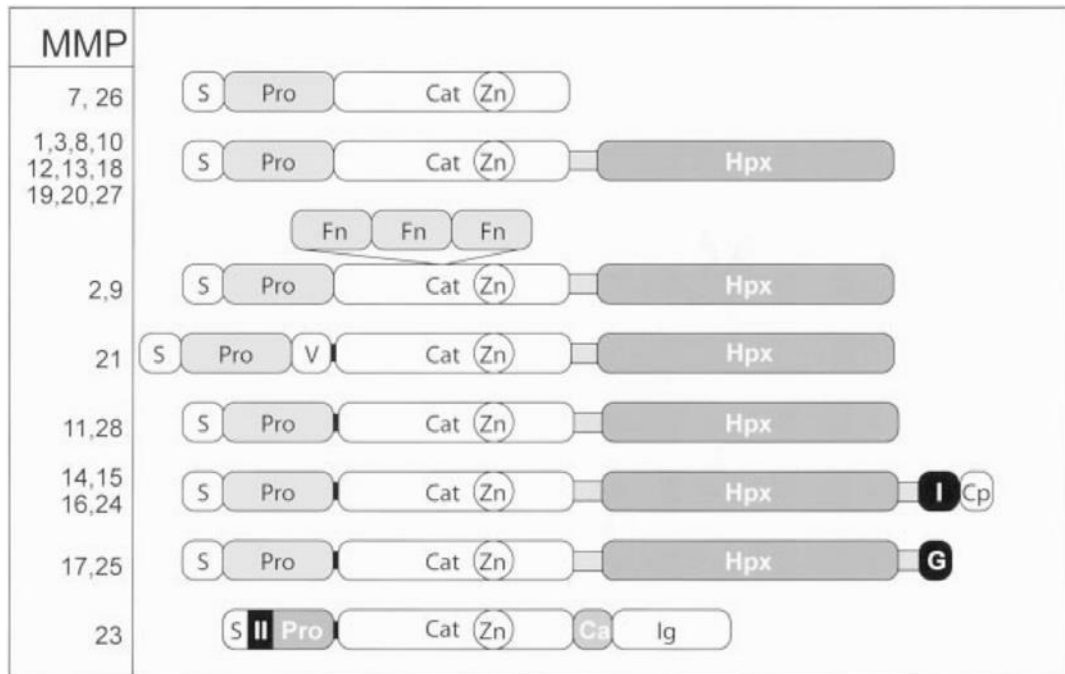


Figura 14. Estructura esquemática de las metaloproteinasas de matriz. Tomado de Visse *et al* [103]

La desregulación de las MMPs y sus inhibidores naturales, causan la destrucción de tejido asociada a enfermedades como diabetes [104], periodontitis en pacientes fumadores y no fumadores [105] [106], osteoporosis en hombres y mujeres postmenopáusicas especialmente [107] [5] [108] [109]. Estas y otras patologías, importantes en la relación oral-sistémica presentan elevada prevalencia y deben ser estudiadas y controladas desde la bioquímica de las MMPs. Se usan con frecuencia las MMPs como marcadores diagnósticos de éstas y otras enfermedades.

La MMP9, que corresponde a gelatinasa junto con la MMP2, es la más abundante e interviene en el reclutamiento de osteoclastos, en la liberación factores de crecimiento y clivaje de proteínas no colágenas. El interés en la MMPs con respecto a la biología ósea, radica en que cuando hay sobreexpresión de estas, especialmente MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP12 y MMP14 se asocian estados de osteopenia y osteoporosis; en tanto que una disminución de ellas o un aumento de TIMPs (inhibidores endógenos de las MMPs) produce ganancia neta de hueso.

Por último, es importante resaltar que las MMPs se usan como indicadores diagnósticos en periodontitis y que, si bien están presentes en la sangre de todo paciente sano, solo se encuentran grandes cantidades de sus formas activas y latentes en pacientes enfermos [110].

---

## SECCIÓN II

---

### Investigación científica para el desarrollo de un compuesto Hidroxiapatita-Carragenano-Doxiciclina (HAp-CRG-Dox)

#### 1. Objetivos

##### 1.1 Objetivo general

Desarrollar un sustituto óseo inyectable con Hidroxiapatita/Carragenano/Doxiciclina para su potencial uso en ingeniería de tejidos del complejo maxilofacial

##### 1.2 Objetivos específicos

1.2.1 Establecer un protocolo para la fabricación de sustituto óseo inyectable de hidroxiapatita/carragenano/doxiciclina.

1.2.2 Evaluar las propiedades morfológicas, de biodegradabilidad, inyectabilidad y biocompatibilidad *in vitro* de los sustitutos óseos fabricados.

1.2.3 Evaluar el efecto de la adición de tetraciclina en las propiedades del sustituto óseo.

Para cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo de investigación se realizaron diferentes ensayos de caracterización química, mecánica, biológica y de actividad contra las metaloproteinasas de matriz de la doxiciclina incorporada en sustitutos óseos de carragenano y nanohidroxiapatita sintetizada por método hidrotermal. Las pruebas se realizaron en los laboratorios de la Universidad de Antioquia y en los laboratorios NANBiomat y biología molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Santiago de Chile).

## **2. Hipótesis de trabajo**

2.1 Un material compuesto inyectable de hidroxiapatita sintética, carragenano comercial y doxiciclina grado analítico es un novedoso y apropiado material para ser empleado como sustituto óseo en el complejo dento-maxilo- facial.

2.2 La incorporación de un medicamento como la doxiciclina hclato no afecta las propiedades físico-químicas del compuesto manteniendo la acción biológica inmunomoduladora de tejidos.

3. Antecedentes más relevantes de los tres materiales precursores en los últimos 20 años

Antecedentes material compuesto HAp-CRG-Dox últimos 10 años

Ficha técnica I

\*Herramienta bibliográfica: **Science Direct (SD)**

\*Palabras de búsqueda: **a. Carrageenan; b. Hydroxyapatite ; c. Doxycycline**

\*Filtro 1: **Años 1998 a 2007**

\*Filtro 2: **Review**

\*Criterio de selección: **Relevancia SD, Relevancia para el presente trabajo**

a. Carragenano (CRG)

Los autores señalan algunas propiedades importantes y aplicaciones prácticas de polímeros solubles en agua como hidroxipolipilcelulosa, hidroxietilcelulosa, celulosa carboximetil de sodio, metilcelulosa hidropil, polivinilpirrolidona, pectina, carragenano y goma guar que tienen amplia aplicación en la industria farmacéutica. "En solución acuosa y en presencia de cationes forma geles termorreversibles y puede dar estabilidad al modificar la reología de la fase acuosa continua" [5].

Los polímeros naturales están siendo muy usados por su similitud con la matriz extracelular, alta versatilidad química, buen desempeño biológico, interacción celular inherente, degradabilidad controlada por células o enzimática; haciéndolos opciones muy atractivas en el campo de la ingeniería de tejidos y aplicaciones en el campo de la liberación de fármacos. "Clasificándolos en grupos según el origen sea proteico, polisacárido (carragenano) y polihidroxicarbonatos" [2].

b. Hidroxiapatita sintética (HAp)

HAp y matrices de hidroxiapatita como alternativa de sustituto óseo en defectos periodontales intraóseos. En general se han usado todos los fosfatos de calcio, de uso frecuente también matrices óseas desmineralizadas con resultados variables [6].



Materiales de regeneración inyectables para complejo maxilofacial[8].

c. Doxiciclina (Dox)

Acciones anti-inflamatorias reconocidas de las tetraciclinas [7]:

1. Inhibición de quimiotaxis
2. Inhibición de formación de granuloma
3. Inhibición proteasas

Inhibidores de las proteinasas como la doxiciclina pueden evitar las intervenciones quirúrgicas y la mortalidad de los aneurismas aórticos, que son un gran problema de salud pública en Estados Unidos [9].

Las búsquedas:

"carra-hydroxyapatite": 0 resultados

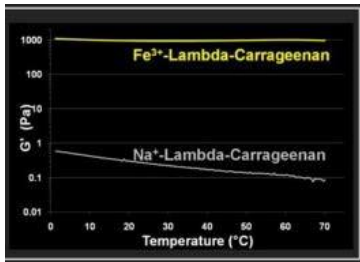
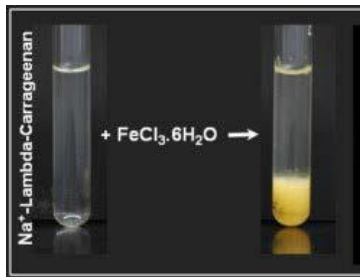
"carra-hydroxyapatite-dox": 0 resultados

"carra-tissue-engin dental": 0 resultados

\*Materiales osteoconductivos con propiedades de autofraguado son ideales como inyectables, con la CRG se desarrollan geles termosensibles formadores de apatita mediante la incorporación de iones Na y K del fluido fisiológico simulado [1]. \*Entre las opciones de biomateriales y biotecnología, los polímeros nanocompuestos tienen mayor potencial principalmente gracias a su excelente resistencia

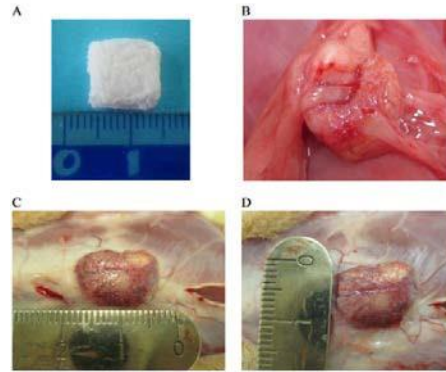
	<p>“Las algas de agua fresca o marina, desarrollan estrategias de defensa que se traducen en una enorme diversidad de compuestos. Esta revisión describe los principales metabolitos biosintetizados por algas, con potencial impacto en ciencia de alimentos, industria farmacéutica y salud pública. Se hace énfasis en ácidos grasos, esteroides, carotenoides, polisacáridos, lectinas, aminoácidos...” [3].</p>	<p>El uso de HAp como material para procedimientos de aumento de reborde alveolar ya desde 1998 tenía ventajas reconocidas: [10]</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fácil manipulación</li> <li>2. Propiedades mecánicas adecuadas</li> <li>3. Biocompatible y estable</li> <li>4. Unión fuerte a hueso y tejido blando</li> <li>5. Resistente a infección</li> <li>6. Sin efectos adversos</li> </ol>	<p>Desescalar antibióticos sistémicos en adultos mayores, en general en la población debe evitarse la resistencia bacteriana, en ese sentido se prefieren los mecanismos de acción local y tópica [11].</p>	<p>mecánica, gran relación área/volumen, alto módulo elástico, viscosidad y propiedades magnéticas [2].</p> <p>* Carragenano kappa actúa como entrecruzante de compuestos colágeno-CRG-HAp. El CRG disminuyó la tendencia higroscópica del par COL [3].</p> <p>* Andamios de CRG y fibroína demostraron buenos resultados como un osteoconductor de poros bien interconectados [4].</p>
<p>Ficha técnica II</p> <p>*Herramienta bibliográfica: <b>Science Direct (SD)</b></p> <p>*Palabras de búsqueda: <b>a. carrageenan-tissue engineering; b. Hydroxyapatite-dental-</b></p>	<p>La radiación por microondas reduce significativamente el uso de solventes tóxicos, el tiempo de reacción para injertos de polímeros sintéticos. Los grupos sulfatos del carragenano y su formación de radicales aniónicos son claves de esta técnica mejorada de copolimerización [12].</p>	<p>La incorporación de partículas de plata a la HAp, parece superar la deficiencia de esta última como antibacteriana. Se encontraron buenos resultados sobre <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> [13].</p>	<p>Nanopartículas sintetizadas de Ag y doxiciclina demostraron acción antibacteriana contra Gram + y Gram - con la ventaja de que pueden ser recuperadas del medio y usarse varias veces [14].</p>	

<p><b>biomateriales; c. Doxycycline-dental-biomateriales</b></p> <p>*Filtro 1: <b>Años 2008 a 2019</b> *Filtro 2: <b>Review y Research article</b></p> <p>*Criterio de selección: <b>Relevancia SD, Relevancia para el presente trabajo</b></p>	<p>“La biomasa de algas es una fuente excelente renovable para la producción de polímeros y otros... por su tasa alta de crecimiento, alta eficiencia fotosintética, gran potencial para fijación de carbono, porcentaje bajo de lignina y alto de carbohidratos”, “las moléculas de sulfato tienen un papel reportado como antioxidante, antiviral y anticancer”. Importante: Tabla 1. Impacto económico de biomasa de origen en algas [4].</p>	<p>Andamios micro y nano estructurados de hidroxiapatita para imitar la estructura jerárquica del hueso natural [14].</p>	<p>Las propiedades mucoadhesivas de quitosano y anti-inflamatorias de la doxiciclina, combinadas mediante incorporación de micropartículas en matriz polimérica pueden implantarse localmente en las bolsas periodontales para el control de la periodontitis [15].</p>	
	<p>“Los tratamientos de superficie por polímeros polisacáridos, se convierten en un medio promisorio para luchar contra las infecciones asociadas a implantes”. Ya comprobadas las propiedades antibiopelícula de algas cafés y rojas (alginatos y carragenanos). Mecanismo de acción propuesto para ello: repulsión electrostática, la carga neta de la pared bacteriana le da carga negativa, al igual que los polisacáridos catiónicos.</p>	<p>También es muy frecuente encontrar estas asociaciones tetraciclina-HAp, pero para biorremediación. Para los fines de este trabajo, confirma la buena afinidad entre los dos compuestos, la HAp ha sido usada también como captador de metales pesados, colorantes y otros, ya que tiene excelentes capacidades de adsorción [16].</p>		
	<p>“Carragenano lambda, si puede formar geles con el uso de cationes trivalentes, en especial Fe<sup>3+</sup>”. Se resalta que faltan estudios en este campo[17] [18].</p>	<p>El buen desempeño de las HAp sintéticas hace posible pasar a evaluaciones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con muy buenos resultados de viabilidad celular [19].</p>	<p>Tetraciclinas en HAp y Bonelike® “La asociación de un agente terapéutico (que previene la infección bacteriana e induce formación de hueso) a un biomaterial que repara/regenera los defectos óseos,</p>	



Carragenano con Fe

Experimento *in vivo* HAp



puede contribuir a un resultado clínico más predecible” [20].

Estos cuadros son un compendio de los antecedentes más relevantes del proyecto, se construyeron y modificaron durante todo el proceso de la experimentación. En la etapa inicial, para identificar el vacío que se buscaba llenar, qué intentos se habían hecho anteriormente; durante el proceso, para actualizar y enriquecer hallazgos previstos y emergentes; en la etapa final, para actualizar que no se hubiera resuelto en la literatura y para explicar los mecanismos y fenómenos encontrados. En conjunto, revela otros posibles campos de exploración o proyectos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] I. Y. Kim, R. Iwatsuki, K. Kikuta, Y. Morita, T. Miyazaki y C. Ohtsuki, "Thermoreversible behavior of  $\kappa$ -carrageenan and its apatite-forming ability in simulated body fluid", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 7, pp. 1472–1476, 2011.
- [2] S. Kumar, Sarita, M. Nehra, N. Dilbaghi, K. Tankeshwar, y K. H. Kim, "Recent advances and remaining challenges for polymeric nanocomposites in healthcare applications", *Prog. Polym. Sci.*, vol. 80, pp. 1–38, 2018.
- [3] W. Feng, S. Feng, K. Tang, X. He, A. Jing, y G. Liang, "A novel composite of collagen-hydroxyapatite/ $\kappa$ -carrageenan", *J. Alloys Compd.*, vol. 693, pp. 482–489, 2017.
- [4] J. Nourmohammadi, F. Roshanfar, M. Farokhi y M. Haghbin Nazarpak, "Silk fibroin/ $\kappa$ -carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 951–958, 2017.
- [5] J.H. Guo, G. Skinner, W. Harcum y P. Barnum, "Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers", *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 1, no. 6, pp. 254–261, 1998.
- [6] P. J. Hanes, "Bone replacement grafts for the treatment of periodontal intrabony defects", vol. 19, pp. 499–512, 2007.
- [7] G. Webster y J. Q. Del Rosso, "Anti-Inflammatory activity of tetracyclines", *Dermatol Clin.* vol. 25, pp. 133–135, 2007.
- [8] E. K. Molioli, P. A. Clark, X. Xin, S. Lal y J. J. Mao, "Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering", *Adv Drug Deliv Rev.* vol. 59, pp. 308–324, 2007.
- [9] F. Aziz y H. Kuivaniemi, "Review role of matrix metalloproteinase inhibitors in preventing abdominal aortic aneurysm", *Ann Vasc Surg* pp.392–401.
- [10] J. W. Frame, "Hydroxyapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation", *Int. J. Oral Maxillofac.Surg.*, vol. 16, no.6, pp. 642–655, 1987.
- [11] A. R. Herring y J. C. Williamson, "Principles of Antimicrobial Use in Older Adults", *Clin Geriatr Med*, vol. 23, pp. 481–497, 2007.
- [12] R. Bhosale, H. V Gangadharappa, A. Mmmm y D. V Gowda, "A review on grafting modification of polysaccharides by microwave irradiation-distinctive practice for application in index academic sciences review article a review on grafting modification of polysaccharides by microwave irradiation- distinctive practice for application in drug delivery", *IJCPR*, Volume 6, Issue 1, January-February 2015.
- [13] J. Wang, X. Gong, J. Hai, y T. Li, "Synthesis of silver e hydroxyapatite composite with improved antibacterial properties", *Vaccum*, vol. 152, pp. 132–137, 2018.
- [14] Y. Junejo y M. Safdar, "Highly effective heterogeneous doxycycline stabilized silver nanocatalyst for the degrad uprofen and paracetamol drugs", *Arab. J. Chem.*, 2015.
- [15] S. Gjoseva *et al.*, "Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment", *Carbohydr. Polym.*, vol. 186, no. August 2017, pp. 260–272, 2018.
- [16] M. Harja y G. Ciobanu, "Science of the Total Environment Studies on adsorption of oxytetracycline from aqueous solutions onto hydroxyapatite", *Sci. Total, Environ.*, vol. 628–629, pp. 36–43, 2018.
- [17] Y. Cao *et al.*, "Specific binding of trivalent metal ions to  $\lambda$ -carrageenan", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 350–356, 2018.
- [18] C.A Running, R Falshaw y S. Janaswamy, " Trivalent Iron Induced Gelation in Lambda-Carrageenan", *Carbohydrate polymer* vol 87,4, pp 2735-2739, 2012.
- [19] J. Kozłowska *et al.*, "Preliminary *in vitro* and hydroxyapatite and bonelike *in vivo* assesment of midified collagen/hydroxyapatite", *Mater.Lett.*, vol 221, pp.74-76, 2018.
- [20] P.S Gomes, J.D. Santos y M.H. Fernandes, " Cell-induced response by tetracyclines on human bone marrow colonized hydroxyapatite and bonelike", *Acta Biomater.*, vol.4, pp.630-637,2008.



- [21] I. Y. Kim, R. Iwatsuki, K. Kikuta, Y. Morita, T. Miyazaki y C. Ohtsuki, "Thermoreversible behavior of  $\kappa$ -carrageenan and its apatite-forming ability in simulated body fluid", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 7, pp. 1472–1476, 2011.
- [22] S. Kumar, Sarita, M. Nehra, N. Dilbaghi, K. Tankeshwar, y K. H. Kim, "Recent advances and remaining challenges for polymeric nanocomposites in healthcare applications", *Prog. Polym. Sci.*, vol. 80, pp. 1–38, 2018.
- [23] W. Feng, S. Feng, K. Tang, X. He, A. Jing, y G. Liang, "A novel composite of collagen-hydroxyapatite/ $\kappa$ -carrageenan", *J. Alloys Compd.*, vol. 693, pp. 482–489, 2017.
- [24] J. Nourmohammadi, F. Roshanfar, M. Farokhi y M. Haghbin Nazarpak, "Silk fibroin/ $\kappa$ -carrageenan composite scaffolds with enhanced biomimetic mineralization for bone regeneration applications", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 951–958, 2017.
- [25] J.H. Guo, G. Skinner, W. Harcum y P. Barnum, "Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers", *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 1, no. 6, pp. 254–261, 1998.
- [26] P. J. Hanes, "Bone replacement grafts for the treatment of periodontal intrabony defects", vol. 19, pp. 499–512, 2007.
- [27] G. Webster y J. Q. Del Rosso, "Anti-Inflammatory activity of tetracyclines", *Dermatol Clin.* vol. 25, pp. 133–135, 2007.
- [28] E. K. Moioli, P. A. Clark, X. Xin, S. Lal y J. J. Mao, "Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering", *Adv Drug Deliv Rev.* vol. 59, pp. 308–324, 2007.
- [29] F. Aziz y H. Kuivaniemi, "Review role of matrix metalloproteinase inhibitors in preventing abdominal aortic aneurysm", *Ann Vasc Surg* pp.392–401.
- [30] J. W. Frame, "Hydroxyapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation", *Int. J. Oral Maxillofac.Surg*, vol. 16, no.6, pp. 642–655, 1987.
- [31] A. R. Herring y J. C. Williamson, "Principles of Antimicrobial Use in Older Adults", *Clin Geriatr Med*, vol. 23, pp. 481–497, 2007.
- [32] R. Bhosale, H. V Gangadharappa, A. Mmmm y D. V Gowda, "A review on grafting modification of polysaccharides by microwave irradiation-distinctive practice for application in index academic sciences review article a review on grafting modification of polysaccharides by microwave irradiation- distinctive practice for application in drug delivery", *IJCPR*, Volume 6, Issue 1, January-February 2015.
- [33] J. Wang, X. Gong, J. Hai, y T. Li, "Synthesis of silver e hydroxyapatite composite with improved antibacterial properties", *Vaccum*, vol. 152, pp. 132–137, 2018.
- [34] Y. Junejo y M. Safdar, "Highly effective heterogeneous doxycycline stabilized silver nanocatalyst for the degrad uprofen and paracetamol drugs", *Arab. J. Chem.*, 2015.
- [35] S. Gjoseva *et al.*, "Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment", *Carbohydr. Polym.*, vol. 186, no. August 2017, pp. 260–272, 2018.
- [36] M. Harja y G. Ciobanu, "Science of the Total Environment Studies on adsorption of oxytetracycline from aqueous solutions onto hydroxyapatite", *Sci. Total, Environ.*, vol. 628–629, pp. 36–43, 2018.
- [37] Y. Cao *et al.*, "Specific binding of trivalent metal ions to  $\lambda$ -carrageenan", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 350–356, 2018.
- [38] C.A Running, R Falshaw y S. Janaswamy, " Trivalent Iron Induced Gelation in Lambda-Carrageenan", *Carbohydrate polymer* vol 87,4, pp 2735-2739, 2012.
- [39] J. Kozłowska *et al.*, "Preliminary *in vitro* and hydroxyapatite and bonelikein vivo assesment of midified collagen/hydroxyapatite", *Mater.Lett.*, vol 221, pp.74-76, 2018.
- [40] P.S Gomes, J.D. Santos y M.H. Fernandes, " Cell-induced response by tetracyclines on human bone marrow colonized hydroxyapatite and bonelike", *Acta Biomater.*, vol.4, pp.630-637,2008.

## 4. Metodología: síntesis, obtención y caracterización de materiales precursores y del material compuesto

### 4.1 Materiales precursores: hidroxiapatita, carragenano y doxiciclina

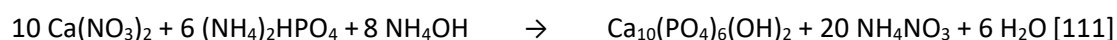
#### 4.1.1 Hidroxiapatita sintética

El proceso de obtención de nano-HAp seleccionado corresponde al protocolo de fabricación de nanohidroxiapatita por método hidrotermal desarrollado en el Grupo de Investigación en Biomateriales-Biomat de la Universidad de Antioquia, en el cual se utilizan el fosfato tipo dihidrógeno de amonio y el nitrato de calcio tetrahidratado como fuentes de fosfato (P) y calcio respectivamente (Ca). Los parámetros de la síntesis se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros para síntesis de nanohidroxiapatita por la técnica de precipitación/tratamiento hidrotermal

Fuente de calcio	Fuente de fósforo	Técnica de mezcla	Parámetros del reactor	Parámetros de secado	Proceso final
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Goteo de P sobre Ca, con agitación magnética a velocidad controlada (1 gota por segundo)	180 °C 24 h	80 °C 24 h	Macerado manual en mortero

La reacción química que se produce en el reactor se describe a continuación:



Se modificó el pH de la HAp obtenida re-suspendiendo el polvo en agua MilliQ® (agua ultra purificada por procesos de filtrado sucesivo y ósmosis reversa) y adicionando NaOH 1M gota a gota hasta obtener un pH de 7 (El pH es importante en todo implante para mantener la osmolaridad celular y la homeostasis del sistema).

La caracterización morfológica de HAp sintética para evaluar la forma y tamaño de las partículas de hidroxiapatita obtenidas, se hizo por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), usando un microscopio marca JEOL modelo JSM-6490LV. Para la caracterización química y de fases, se realizó EDX para hacer análisis semicuantitativo de la composición de la hidroxiapatita en el dispositivo para EDX acoplado al microscopio. Se realizó la caracterización de rayos X (DRX) por medio de un difractómetro de rayos X para polvos Rigaku® con fuente de Co, con  $\lambda = 1,5818 \text{ \AA}$  a un ángulo de  $2\theta$  y un rango de  $0^\circ$  a  $60^\circ$ . Los difractogramas se analizaron con el programa especializado para análisis de fases difracción de polvos de la empresa Crystal impact (Match 3, Crystal

Impact). Los patrones obtenidos se compararon con los de referencia de la base de datos COD. Para complementar los análisis de difracción de rayos X, se evaluó el material por medio de espectroscopia infrarroja en modo reflectancia atenuada (ATR-FTIR) con un equipo Agilent Cary 630 del laboratorio NanBiomat de la Universidad de Chile.

#### 4.1.2 Carragenano comercial

El material utilizado fue provisto por la empresa Caisson Lab. (ver ficha técnica en anexo A). Se realizó una prueba simple para identificar el hidrocoloide predominante. Se adicionaron 4 g de carragenano en polvo a 200 mL de agua destilada y se calentó la mezcla a 80 °C con agitación magnética constante hasta disolución completa. Se reemplazó la pérdida de agua por evaporación y se enfrió hasta temperatura ambiente. A 50 mL de solución o gel se adicionaron 200 mg de KCl, se calentó nuevamente entre 70 y 80 °C, se mezcló bien y finalmente se dejó enfriar. Se compensó la pérdida de agua por evaporación y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se hizo una valoración subjetiva de la capacidad gelificante y del tipo de gel formado.

#### 4.1.3 Doxiciclina hclato grado analítico de PAN Tech®

El material usado como medicamento adicionado al compuesto polímero cerámico desarrollado fue de grado analítico marca Pan Biotech® Alemania, ver ficha técnica en anexo B. Se confirmó el material tipo doxiciclina hclato con ATR-FTIR marca Agilent Cary 630.

### 4.2 Material compuesto HAp/CRG/Dox

Se usó agua destilada para disolver el polímero en proporción 1,5 % relación p/v, nanohidroxiapatita sintética en relación de 60 % p/v y glutaraldehído como entrecruzante en relación 5 % en peso con respecto al polímero. Las concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina se obtuvieron por diluciones sucesivas (40 mg de polvo disuelto en 1 mL de agua destilada) y se adicionaron en cantidad de 1 µg/3 mL (Tabla 2).

El material se dispuso en jeringas desechables nuevas de 5 cm de capacidad para los ensayos de inyectabilidad. Para las pruebas de compresión y degradación en SBF se fabricaron cilindros de 14 mm de radio y 4 mm de altura. Con jeringas de insulina se llenaron las cavidades troqueladas en los agares para estudios antimicrobianos. Para las pruebas de electroforesis SDS-PAGE se usaron pequeñas esferas de 2,5 mm. Las concentraciones subantimicrobianas que fueron evaluadas se presentan en la Tabla 2 y las concentraciones antimicrobianas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2. Nomenclatura de las concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina usadas

Nombre	Doxiciclina $\mu\text{g/mL}$
<b>0 Dox</b>	Sin
<b>0,2 Dox</b>	02
<b>2 Dox</b>	2
<b>20 Dox</b>	20
<b>200 Dox</b>	200
<b>400 Dox</b>	400

Tabla 3. Nomenclatura de las concentraciones de doxiciclina en los sustitutos con potencial acción antimicrobiana

Nombre	Doxiciclina
<b>800 Dox</b>	800 $\mu\text{g/mL}$
<b>4000 Dox</b>	4000 mg/mL
<b>50000 Dox</b>	50000 mg/mL
<b>0Dox0Glu</b>	No Dox, No gluta

En la Figura 1, se presenta un esquema del proceso de preparación y caracterización de los sustitutos óseos.

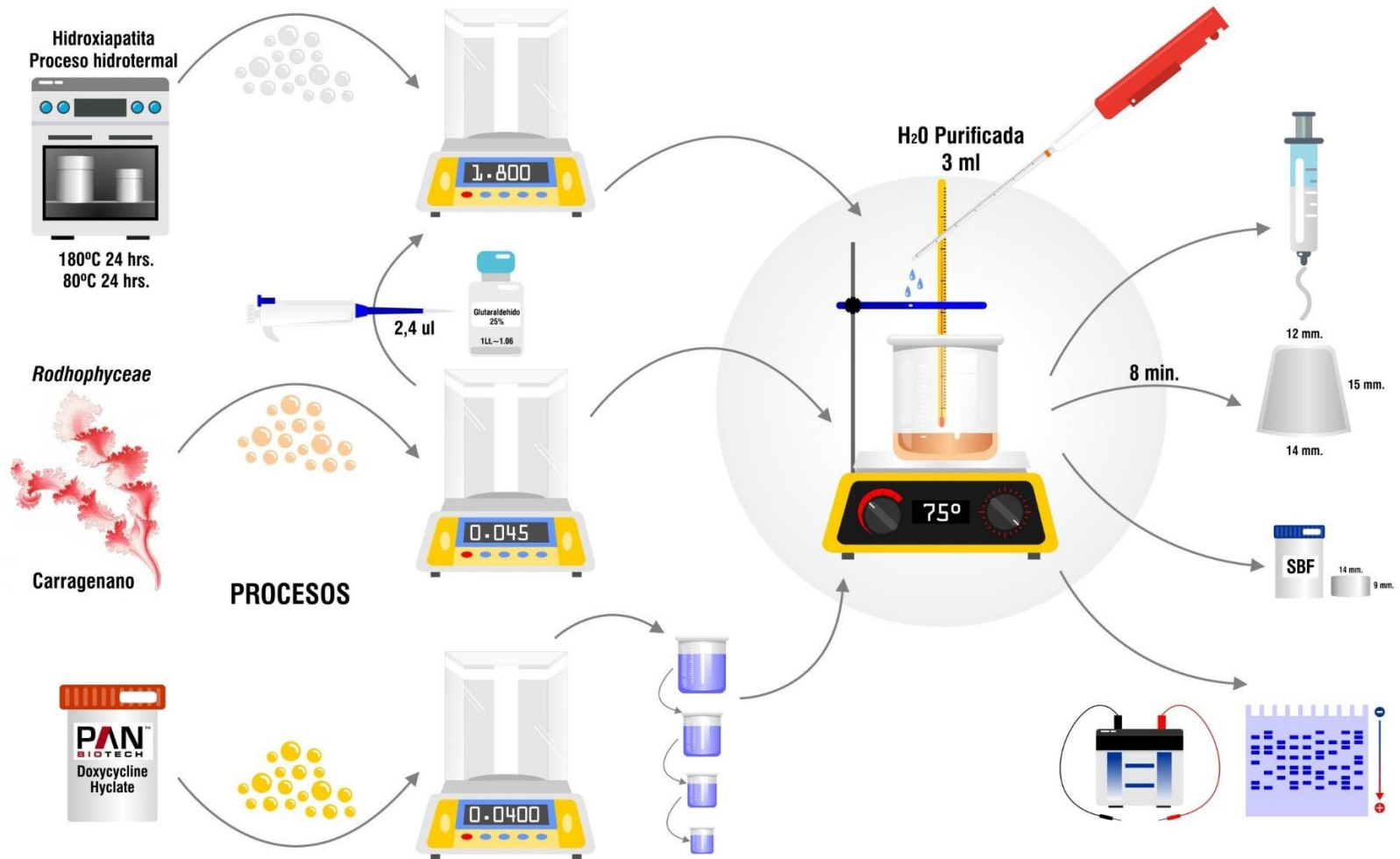


Figura 1. Resumen gráfico del protocolo de preparación del material compuesto HAp-CRG-Dox  
Fuente propia

#### 4.2.1 Caracterización mecánica

Para evaluar la resistencia mecánica del sustituto óseo, este material se sometió al ensayo de compresión bajo la norma ASTM C1424-04, en una máquina universal de ensayos marca Digimes con una celda de carga de 4900 N y una velocidad de 5 mm/min. Las cinco formulaciones con doxiciclina más el sustituto sin doxiciclina fueron evaluadas con cuatro repeticiones por cada una, dando como universo muestral 20 especímenes.

#### 4.2.2 Inyectabilidad

Para medir la fuerza de extrusión necesaria para inyectar los sustitutos se llenó un volumen igual (2 cm) de cada uno de las formulaciones subantimicrobianas, en una jeringa de 5 cm sin aguja que se fijó verticalmente y perpendicular a la mordaza en una máquina universal de ensayos Digimes con una celda de carga de 4900 N y una velocidad de 5 mm/min (Figura 2). Cada condición se repitió por 3 veces para dar una buena confiabilidad del resultado. Para determinar el porcentaje de material que puede extruirse de la jeringa, se pesaron las jeringas antes y después del experimento para establecer control estadístico de calidad de las jeringas, obteniendo así la relación de inyectabilidad.

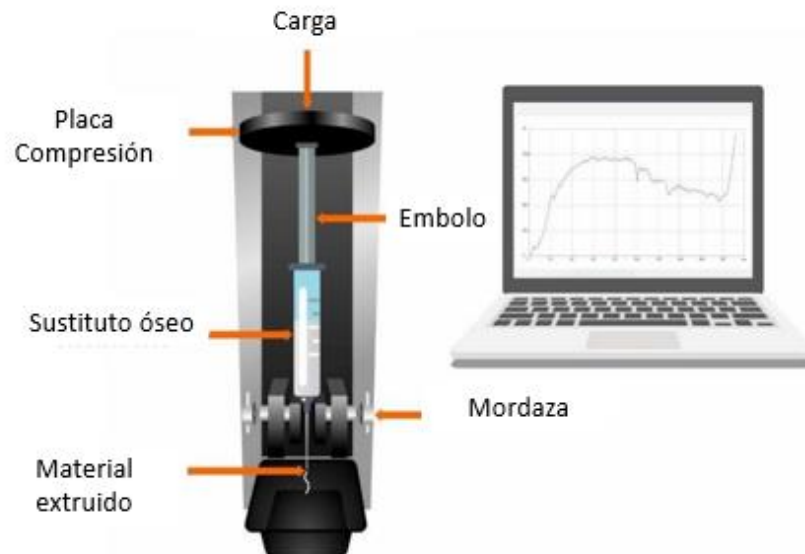


Figura 2. Esquema del experimento de inyectabilidad. Fuente propia

#### 4.2.3 Cinética de degradación

Se evaluó la degradación del sustituto en un fluido fisiológico simulado (Anexo C) a temperatura de 37 °C por períodos de 7, 14, 21 y 28 días con especímenes triplicados de cada uno del sustituto con concentraciones

subantimicrobianas. A los especímenes se les midió pH y peso antes de sumergir y cada día de observación propuesto (La norma ASTM F2900-11 describe la pérdida de masa como una prueba de cinética de degradación para hidrogeles de uso biomédico). La prueba se realizó sumergiendo los cilindros del material en contenedores plásticos, con SBF elaborado en el laboratorio según el protocolo de Kokubo [112]. Luego, al observar los resultados, se realizó una nueva prueba por duplicado observando detalladamente los primeros 7 días de inmersión.

#### 4.2.4 Bioactividad

El material a evaluar se conformó en cilindros de 14 mm de diámetro por 4 mm de altura que fueron sumergidos en recipientes plásticos con SBF fabricado en el laboratorio Biomat según el protocolo de Kokubo modificado (Ver composición y método de preparación en ANEXO C), con pH ajustado a 7,4, en agitación constante y temperatura de 36,5 °C como lo indica el protocolo de la prueba de bioactividad del mismo autor [112], con tres repeticiones por cada grupo de material compuesto con diferentes concentraciones subantimicrobianas y el grupo control sin doxiciclina. Se evaluaron las muestras a los 3 y 7 días con espectrometría ATR-FTIR (Cary 360; Agilent) y SEM (JSM-IT300JEOL).

#### 4.2.5 Actividad antimicrobiana

Con el fin de evaluar si las concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina propuestas en este estudio carecían además de actividad antimicrobiana, se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana en agares estériles Müller-Hinton para *Escherichia coli* (Figura 3A) y agar sangre para *Porfirromona gingivalis* según las indicaciones de la ATCC (Organización de colecciones de cultivo tipo americano que además de dar nombre y código a las cepas bacterianas clasificadas, establece normas internacionales para realizar experimentos con los microorganismos más usados en pruebas biológicas de laboratorio) (Figura 3B). Además, se realizaron las mismas pruebas antibacterianas en sustitutos con concentraciones consideradas antimicrobianas para establecer comparaciones. Se incluyó la evaluación de sustitutos sin el glutaraldehído que hace las veces de entrecruzante, ya que también es usado como agente antibacteriano.

Todos los experimentos con bacterias se realizaron con tres especímenes por cada material, con una réplica el mismo día, bajo las mismas condiciones y una repetición en un día diferente también con tres especímenes por cada concentración de doxiciclina evaluada en los sustitutos.

Dentro de los ensayos preliminares se realizaron pruebas de disco (sensidisc) y prueba de contacto directo tangencial, no obstante, en la primera no se obtenían cantidades repetibles de cada material en el disco y la consistencia del sustituto hacia difícil impregnar el disco. Con la técnica de contacto directo con el agar en forma sobrepuesta, mejoraba la cantidad de material evaluado, pero no se obtenía un área de contacto estable. Por lo tanto, se decidió usar la técnica de troquel para lo cual se utilizaron puntas mezcladoras de silicona de diámetro 6 mm para generar los troqueles que fueron llenados con 46 mg de material fresco de cada sustituto (consistencia pasta). Para el caso de *E. coli*, un crecimiento fácil y rápido tanto en caldo nutritivo como en agar Müeller-Hinton facilitó el experimento y la toma exacta y repetitiva de una concentración 0,5 Mc Farland. Para *P. gingivales* se utilizó la técnica de incubación en jarra de anaerobiosis a 37 °C durante 2 a 3 días para un crecimiento óptimo en agar sangre y así obtener concentraciones de 1 Mc Farland en las muestras.



(A)

(B)

Figura 3. A. Fotografía de agares Müeller-Hinton para crecimiento de *E. coli*, B. Fotografía de esterilización de agares en autoclave

#### 4.2.6 Citotoxicidad

La norma ISO 10993-5 propone usar el extracto del material a evaluar como una prueba de contacto indirecto de las células con el material. Por lo tanto, cada sustituto se dejó en el medio basal DMEM durante 24 h y del sobrenadante se tomaron tres muestras por cada material que fueron llevados a placas de cultivo de 96 pozos, adicionando en cada pozo 10  $\mu$ l de extracto y 50  $\mu$ l de medio conteniendo 50.000 células/mL para un volumen total por pozo de 100  $\mu$ l, posteriormente fueron incubados nuevamente por 24 h y se adicionaron 10  $\mu$ l de MTT a 5 mg/mL (concentración final en el pozo de 0,5 mg/mL), seguido por 4 h de incubación a la oscuridad. Finalmente, para disolver los cristales de formazán, se añadieron 100  $\mu$ l de isopropanol-HCl 0,04M y se midió la absorbancia a 571 nm usando un lector de ELISA. La viabilidad se expresa en porcentaje respecto al control negativo. Los datos presentados presentan la media  $\pm$  SEM de tres replicas biológicas por cada grupo experimental.



Como control positivo para supervivencia se utilizó el medio de cultivo y como control negativo de supervivencia, peróxido de hidrógeno se hicieron tres repeticiones en distintos días con las mismas condiciones para garantizar independencia de los resultados.

Con el fin de evaluar la citotoxicidad del material compuesto, se realizaron pruebas MTT en fibroblastos humanos provenientes de cultivo primario de encía humana de pacientes sanos periodontalmente. Esta técnica se basa en detectar la actividad mitocondrial en las células para calcular el porcentaje de supervivencia de las células en contacto con el nuevo material. La selección de la técnica MTT se basa en los reportes de la literatura que la consideran como confiable y económica [113] [114]. Se seleccionaron los fibroblastos gingivales humanos en vez de una línea celular que generalmente proviene de células tumorales que pueden ser más resistentes a los tóxicos, lo que daría un falso negativo como lo indica la literatura [115].

Para realizar el ensayo MTT se usaron fibroblastos gingivales provenientes de un cultivo primario los cuales fueron sembrados en microplatos de 96 pozos, a una densidad de  $1,5 \times 10^4$  células/pozo, en medio DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal (SBF por sus siglas en español, no confundir con la misma sigla usada en este texto para hacer relación a fluido fisiológico simulado que usa esta sigla en inglés) y mantenidos bajo condiciones de cultivo de 37 °C y concentración de 5 % de CO<sub>2</sub>. Se realizaron tratamientos por triplicado a una concentración de 1:10 de las muestras suministradas.

#### 4.2.7 Actividad antimetaloproteinasas

La actividad antimetaloproteinasa de la doxiciclina hiclato en el sustituto óseo inyectable se evaluó por medio de una prueba de zimografía, en el Laboratorio de biología molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se utilizó el ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), del cual se esquematizan los componentes en la Figura 4. Se realizaron alrededor de 20 geles de poliacrilamida al 8 % usando plasma y suero de dos voluntarios sanos. Se realizaron pruebas piloto con diferentes anticoagulantes y se escogió el uso de citrato y heparina como los mejores para obtener la fuente de metaloproteinasas. Se realizaron muestras por triplicado de doxiciclina sola y de los sustitutos óseos con las cinco concentraciones submicrobianas de doxiciclina hiclato.

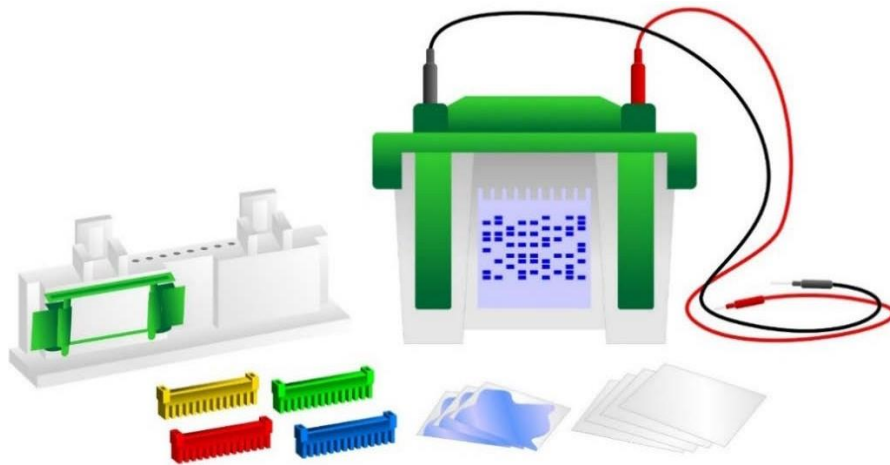


Figura 4. Esquematización de los principales componentes del equipo Miniprotean Biorad® para electroforesis en gel. Se muestra: cubeta de electroforesis, soportes de vidrios, vidrios y peines para diferentes cantidades de pozos. Fuente propia

#### 4.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software libre R 3.4.4, minitab17, ggPlot de R para las gráficas. Los análisis de varianza (ANOVA) para citotoxicidad se realizaron en GraphPad Prism con comparaciones post-hoc realizadas con la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (FPLSD). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . En este trabajo se ajustó un modelo de efectos fijos con la siguiente estructura.

- Para un efecto fijo:  $y_{ij} = B_0 + B_1x_j + \epsilon_{ij}$

Donde:

$y_{ijk}$  es la  $i$  – esima observación a la cual se le aplico el  $j$  – esimo tratamiento en el  $k$ - esimo día.

$B_0$  es el promedio de pH sin tener en cuenta los efectos fijos.

$B_1$  es el efecto sobre la variable respuesta – esimo tratamiento.

$B_2$  es el efecto del día  $k$ - esimo en el que fue medida la variable de respuesta.

$\epsilon$ : es el error aleatorio en la  $i$ -esima muestra de pH debido al  $j$ -esimo tratamiento en el  $k$  – esimo día.

- Para dos efectos fijos:  $y_{ijk} = B_0 + B_1x_j + B_2x_k + \epsilon_{ijk}$

Donde:

$y_{ijk}$  es la  $i$  – esima observación a la cual se le aplico el  $j$  – esimo tratamiento en el  $k$ - esimo día.

$B_0$  es el promedio de pH sin tener en cuenta los efectos fijos.

$B_1$  es el efecto sobre la variable respuesta – esimo tratamiento.

$B_2$  es el efecto del día k- esimo en el que fue medida la variable de respuesta.

$\epsilon$ : es el error aleatorio en la i-esima muestra de pH debido al j-esimo tratamiento en el k – esimo día.

## 5. Resultados y análisis

### 5.1 Materiales precursores

#### 5.1.1 Hidroxiapatita sintética

##### Caracterización morfológica

Las micrografías SEM de la hidroxiapatita obtenida son mostradas en las Figuras 5 y 6. Se pueden observar algunas mediciones realizadas sobre las barras del polvo, donde se observan dimensiones en escala nanométrica en el ancho de las barras. (ancho promedio: 51,71 nm; S= 8,118 y longitudes promedio: 271,42 nm; S= 104,615)

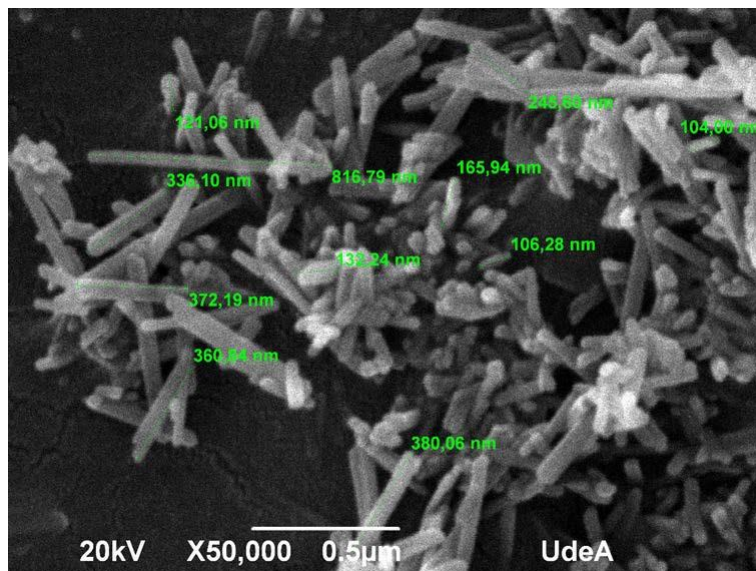


Figura 5. Micrografía de la nanohidroxiapatita sintetizada, se miden las longitudes de las nanobarras

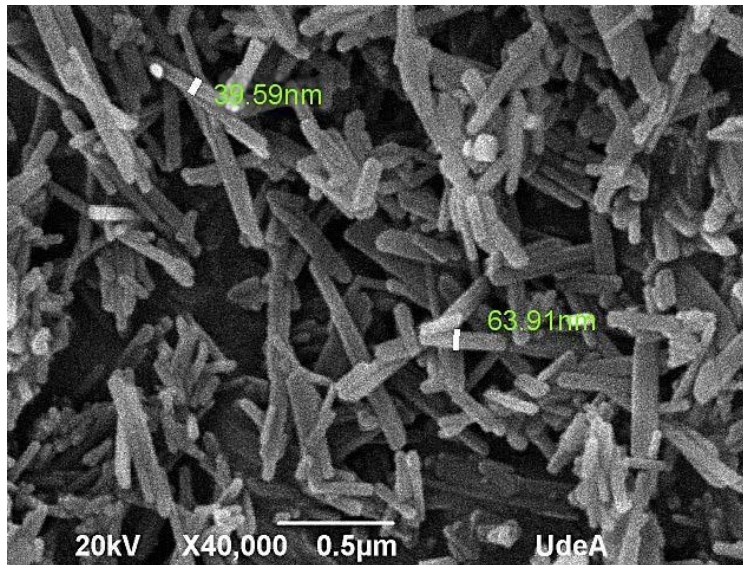


Figura 6. Micrografía de la nanohidroxiapatita sintetizada, se muestran mediciones nanométricas del ancho de las nanobarras

Tamaños similares son reportados por Buitrago y colaboradores (amplitud promedio 44,98 nm y 82,21 nm y longitudes promedio entre 123,91 nm y 151,48 nm) en la obtención de nanopartículas de fosfatos de calcio [116].

#### Caracterización química y de fases

El análisis EDX arroja los resultados que se presentan en la Tabla 4, demostrando una composición química estándar para la HAp y según la norma ASTM 1185-03 para composición química de materiales con HAp sintética.

Tabla 4. Componentes elementales de la nanoHAp obtenida

Elemento	Cantidad	Intensidad	Peso %	Atómico %
<b>C</b>	1,34	0,3490	6,46	12,54
<b>O</b>	6,93	0,3444	33,84	49,30
<b>Na</b>	0,57	0,7523	1,27	1,28
<b>P</b>	16,45	1,3720	20,16	15,17
<b>Ca</b>	21,75	0,9962	36,0	21,34

## Difracción de rayos X (DRX)

El difractograma del material obtenido se muestra en la Figura 7. Se presenta también el difractograma de un polvo cuyo pH fue corregido con la adición de NaOH, con el objetivo de llevarlo a la neutralidad (los materiales implantados deben tener un valor de pH similar al receptor para evitar reacciones adversas) (Figura 8).

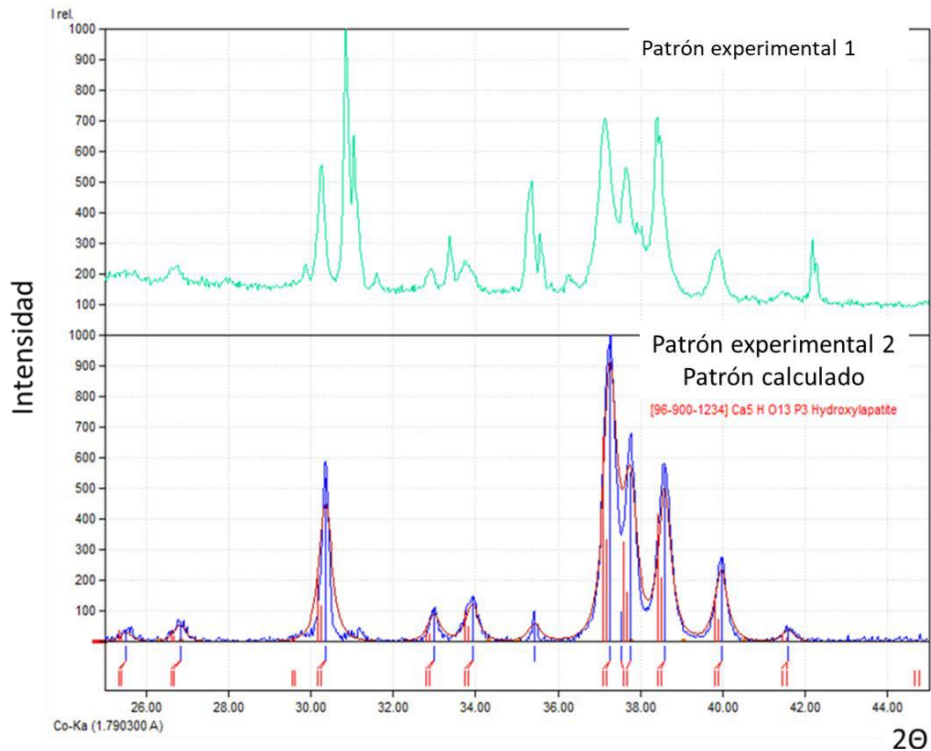


Figura 7. Comparativo de dos muestras de HAp con patrón COD

Al comparar los picos primarios y secundarios con el patrón COD, se confirma que se obtiene una hidroxiapatita similar al estándar, se muestra la estabilización de las fases cristalinas para la hidroxiapatita. Es posible observar los picos principales aproximadamente en  $2\theta=37,5^\circ$ ,  $38^\circ$  y  $38,8^\circ$ , picos secundarios alrededor de  $2\theta=30,6^\circ$ ,  $33,2^\circ$ ,  $34,1^\circ$ ,  $40,2^\circ$ ,  $47^\circ$ ,  $55,2^\circ$  y  $58,5^\circ$  y picos de menor intensidad que aparecen  $2\theta=12,8^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $22,3^\circ$ ,  $25,8^\circ$ ,  $27^\circ$ ,  $41,8^\circ$ ,  $46,3^\circ$ ,  $49,6^\circ$ ,  $51,8^\circ$ ,  $53,5^\circ$ ,  $56,9^\circ$ ,  $59,8^\circ$ .

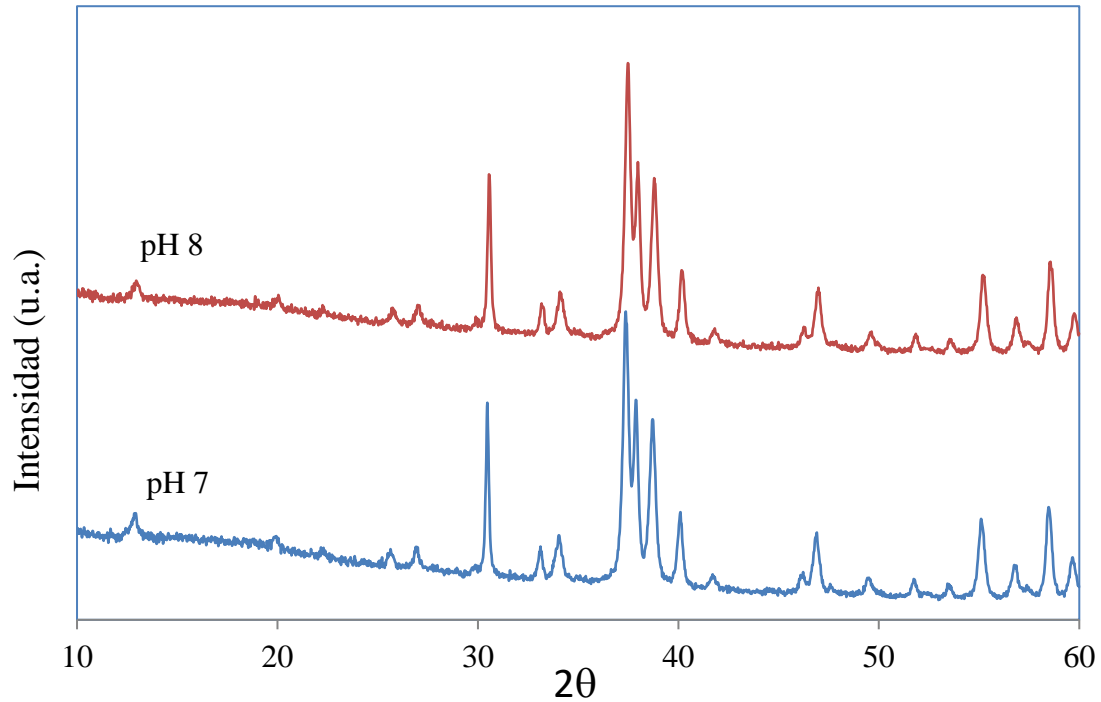


Figura 8. Difractograma de HAp con pH corregido

En la Figura 8 se comprueba que no hay variación cristalográfica del material en la corrección del pH implementada.

#### Espectroscopía infrarrojo modo reflectancia atenuada (ATR-FTIR)

El espectro infrarrojo de la hidroxiapatita obtenida se muestra en la Figura 9. Se observan las bandas de absorción de la hidroxiapatita reportadas por Chandra y Snake [117] [118].

- Grupos  $\text{-OH}$  ( $3568\text{ cm}^{-1}$ ) [117] y ( $664\text{ cm}^{-1}$ ) [118]
- Grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $1041\text{ cm}^{-1}$  y  $570\text{ cm}^{-1}$ ) [117] y ( $603\text{ cm}^{-1}$  y  $962\text{ cm}^{-1}$ ) [118]
- Grupo  $\text{CO}_4^{2-}$  ( $1462\text{ cm}^{-1}$ ) [117]

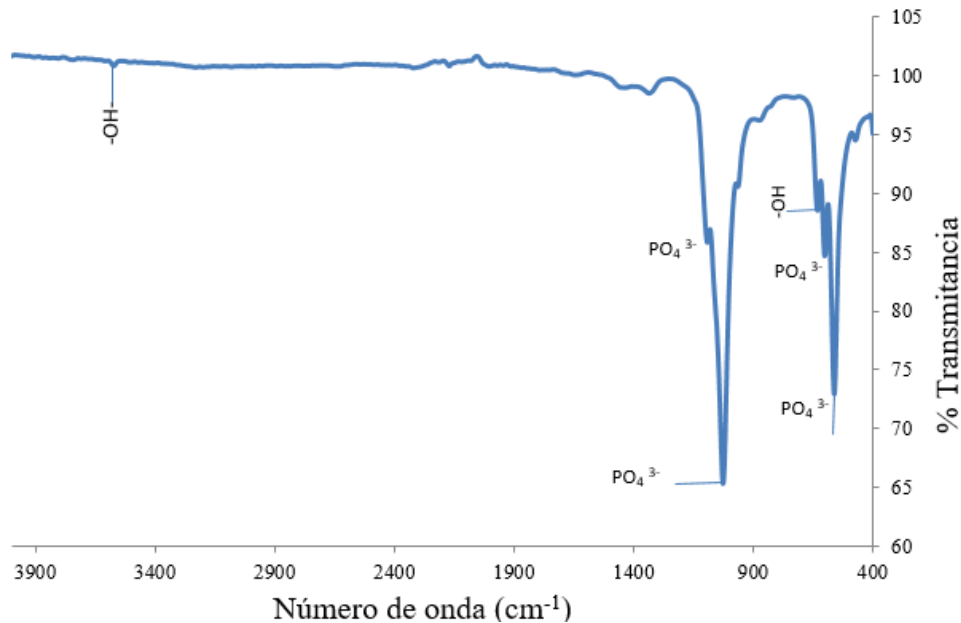


Figura 9. Espectroscopía infrarrojo de nanoHAp obtenida y sus bandas características

### 5.1.2 Carragenano comercial

La formación de un gel frágil demuestra predominancia de carragenano tipo kappa (JECFA 2001). En la Figura 10 se grafica el espectro obtenido con ATR-FTIR. Las bandas de absorción más reportadas para el carragenano kappa como iota se encuentran en  $845\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la galactosa-4-sulfato (CO-SO<sub>4</sub> en C4 de la galactosa; G4S) y  $805\text{ cm}^{-1}$  corresponde a 3,6-anhidro- galactosa-2-sulfato (DA2S) según Gómez-Ordoñez en 2011 [119], absorción en  $803,1\text{ cm}^{-1}$  para iota y  $803,4\text{ cm}^{-1}$  para kappa;  $845,8\text{ cm}^{-1}$  para iota y  $845,5\text{ cm}^{-1}$  para kappa) [119]. Otros autores como Pereira *et al* en 2009 [120] y Tojo *et al* en 2003 [121], relacionan la presencia de la banda  $805\text{ cm}^{-1}$  con carragenano iota y  $850\text{ cm}^{-1}$  a carragenano kappa. En comunicación vía correo electrónico con el autor L. Pereira, se indica “*The bands in FTIR present variations that depend on factors related to the ATR diamonds used, reason why deviations of the values between 803 and 806 cm<sup>-1</sup> are normal*” but “*805 cm<sup>-1</sup> band is exclusive of iota*”. Una revisión más reciente del 2012 en la que evalúan tres tipos de carragenano kappa nativo, experimental y comercial, muestra una señal intensa y particular, que fue registrada en todas las muestras en  $803\text{ a }806\text{ cm}^{-1}$ , la cual es específica de 3,6 hidrogalactosa-2-sulfato [122].

En el 2016, Manuhara *et al* publicaron su trabajo sobre extracción y caracterización de carragenano kappa refinado de algas rojas en el cual señalan “... la presencia de una banda de absorción entre  $845\text{ y }850\text{ cm}^{-1}$  que

determina su clasificación como k-carragenano” , contradiciendo a algunos autores que mencionan la presencia de estas bandas tanto en kappa como en iota (Gómez-Ordóñez) y a otros que señalan la ausencia de la banda en  $805\text{ cm}^{-1}$  en carragenano kappa, como la determinante de su clasificación [123].

No se encuentra en la literatura una explicación definitiva a estas diferencias de hallazgos. Weber *et al* señalan que los carragenanos varían mucho, aunque sean de la misma especie de algas, dependiendo de: tiempo de cosecha, condiciones de profundidad, salinidad, nutrientes, tiempo de crecimiento y procesos de extracción, entre otros; lo que deriva en los diversos resultados entre estudios [ 122].

El autor Pereira sugiere que cuando se refieren a que encuentran esa banda  $805\text{ cm}^{-1}$ , están en realidad hablando de un carragenano híbrido kappa/iota (Comunicación privada, opinion personal del autor vía correo electrónico). Es posible que en algunas investigaciones tuvieran una muestra mixta de kappa/iota, no pura de carragenano kappa como esperaban. Sin embargo, no siendo el objetivo de este trabajo, se manejara el hecho de que las bandas encontradas en el material comprado a Caisson Lab corresponden a un carragenano tipo mixto kappa/iota que posee grupos 3,6 anhidro-galactosa capaces de formar geles, a diferencia de los carragenanos lambda que poseen de residuos de galactosa no formadores de geles (solo espesante).

Otras bandas de absorción identificadas se describen a continuación:

- Estiramiento O-H: ( $3418\text{cm}^{-1}$ ) [124], ( $3600\text{ cm}^{-1}$ ) [125]
- Vibración simétrica de  $\text{CH}_3$ + vibración asimétrica de  $\text{CH}_2$ : ( $2919\text{ cm}^{-1}$ ) [124]
- Polímero unido al agua: ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) [125]
- CO de 3,6 anhidro galactosa ( $930\text{ cm}^{-1}$ ; DA) [119] [126], ( $928\text{ cm}^{-1}$ ) [127]
- Enlace glucosídico: ( $1010\text{ cm}^{-1}$  a  $1080\text{ cm}^{-1}$ )  $1030\text{ cm}^{-1}$  [128]
- Grupo C-O-C: ( $1160\text{-}1155\text{ cm}^{-1}$ ) [46] [125]
- Grupos ester sulfato ( $1260\text{ cm}^{-1}$ ) [119] y ( $1220\text{ cm}^{-1}$ ) [127]
- Grupos sulfato: ( $820$  a  $860\text{ cm}^{-1}$ ) [125]
- Esqueleto de la piranosa o C anomérico de la piranosa ( $749\text{cm}^{-1}$ ,  $770\text{cm}^{-1}$ ): señal débil en FTIR, pero más fuerte en Raman, es común para agares y carragenanos [129]
- O=S=O ( $578\text{ cm}^{-1}$ ) [125]



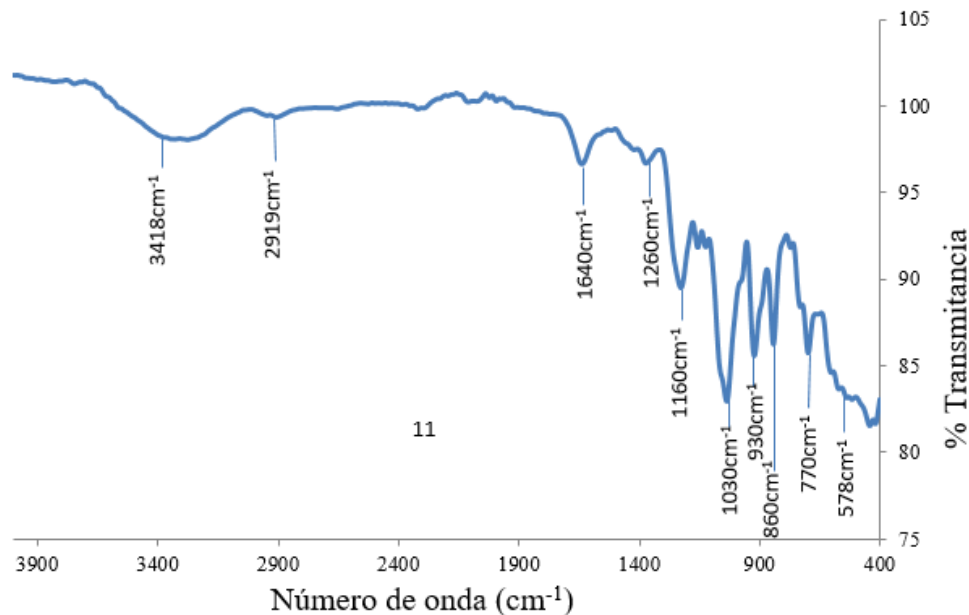


Figura 10. Espectroscopía infrarrojo del carragenano comercial

Al comparar el espectro obtenido con la investigación reciente de Gómez-Ordóñez y Ruperez [112], se comprueba la presencia de las principales bandas de absorción de este material precursor comprado. La predominancia de kappa es una apreciación subjetiva a partir de la prueba con KCl y el hallazgo visual de relativamente poca turbidez, sin embargo, la determinación química exacta y la relación iota/kappa específica puede establecerse con estudios complementarios de resonancia magnética nuclear, lo cual esta fuera del alcance de este estudio.

### 5.1.3 Doxiciclina hclato comercial

La Figura 11 presenta el espectro ATR-FTIR de la doxiciclina, donde se muestran las bandas características que se encuentran entre 1500 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas principales y otras secundarias se encuentran respaldadas en las publicaciones de Gjoseva *et al*, 2018 [130], Kassab *et al*, 2013[131], Kogawa *et al*, 2016 [132], Junejo *et al* [133]. Se indican los números de onda correspondientes a las bandas de vibración en el espectro (Figura 11).

- Grupo-NH ( $3330 \text{ cm}^{-1}$ ) [130]
- $\text{NH}_2$  ( $3282 \text{ cm}^{-1}$ ) [130]
- COOH ( $1700 \text{ cm}^{-1}$ ) [130]
- $\text{CONH}_2$  ( $1600 \text{ cm}^{-1}$ ) [130]
- Flexión  $-\text{CH}_2$  ( $1459 \text{ cm}^{-2}$ ) [131]

- Si-O-Si (1225, 1090, 465  $\text{cm}^{-1}$ ) [132]
- Si-OH (966  $\text{cm}^{-1}$ ) [132]

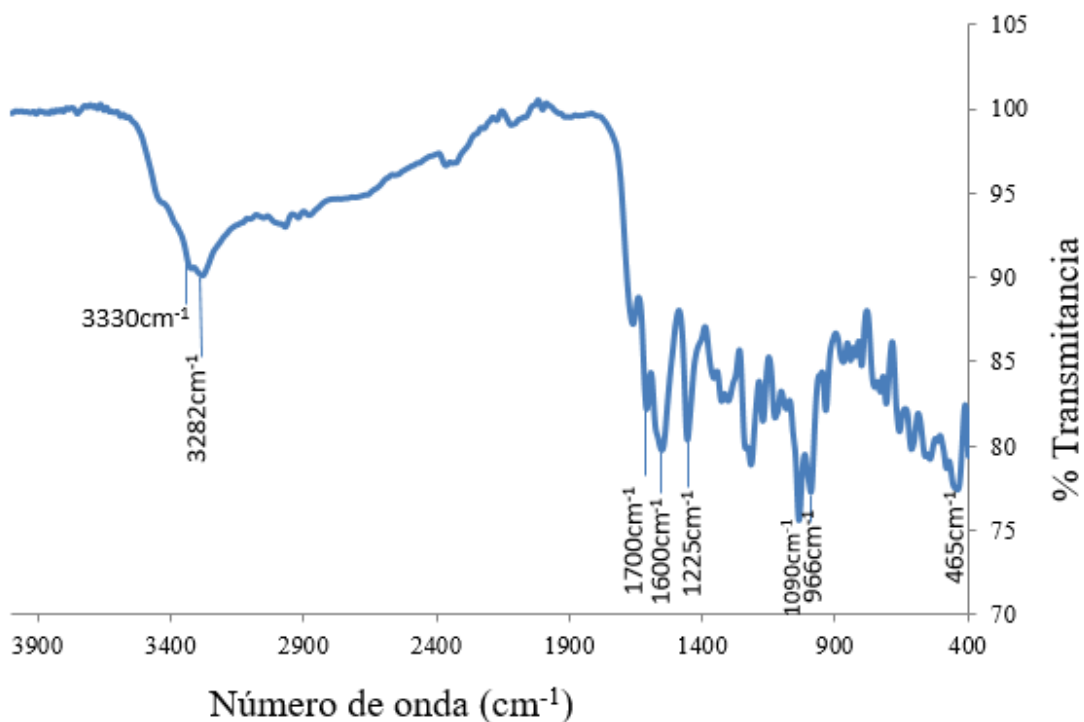


Figura 11. Espectroscopía infrarrojo obtenida de la doxiciclina hclato Pan Biotech®

Kogawa *et al* [132] no reportan las bandas encontradas en forma numérica, pero presentan un espectro sobrepuesto del estandar de la doxiciclina con una muestra del estudio, idéntico al encontrado en el ATR-FTIR realizado a las muestras de este trabajo. Así mismo, Junejo *et al* [133] en su estudio de doxiciclina y partículas de plata, reporta un espectro como el obtenido en el presente trabajo. Petrescu *et al* en 2015 [134] estudian un material mesoporoso como portador de doxiciclina y reportan un FTIR para la doxiciclina hclato en el cual existe coincidencia con las bandas de vibración que se encontró en el material de Pan Biotech® usado.

## 5.2 Material compuesto hidroxiapatita-carragenano-doxiciclina

### 5.2.1 Caracterización mecánica

Las curvas de resistencia a la compresión de los sustitutos sin doxiciclina y con las cinco concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina se muestran en la Figura 12. El comportamiento elástico de los materiales fue similar entre ellos excepto para los materiales 0,2 Dox y 2 Dox. Cuando alcanzan el límite elástico a una carga muy baja (alrededor de 0,2 MPa) disminuye la cantidad de fuerza que debe aplicarse para continuar con la deformación, esto se debe posiblemente al reordenamiento de las cadenas poliméricas (ver meseta) y continúa un aumento de la fuerza requerida para completar la fase plástica y terminar en una deformación del 75 % antes de que choquen las mordazas, a un esfuerzo promedio de 0,6 MPa.

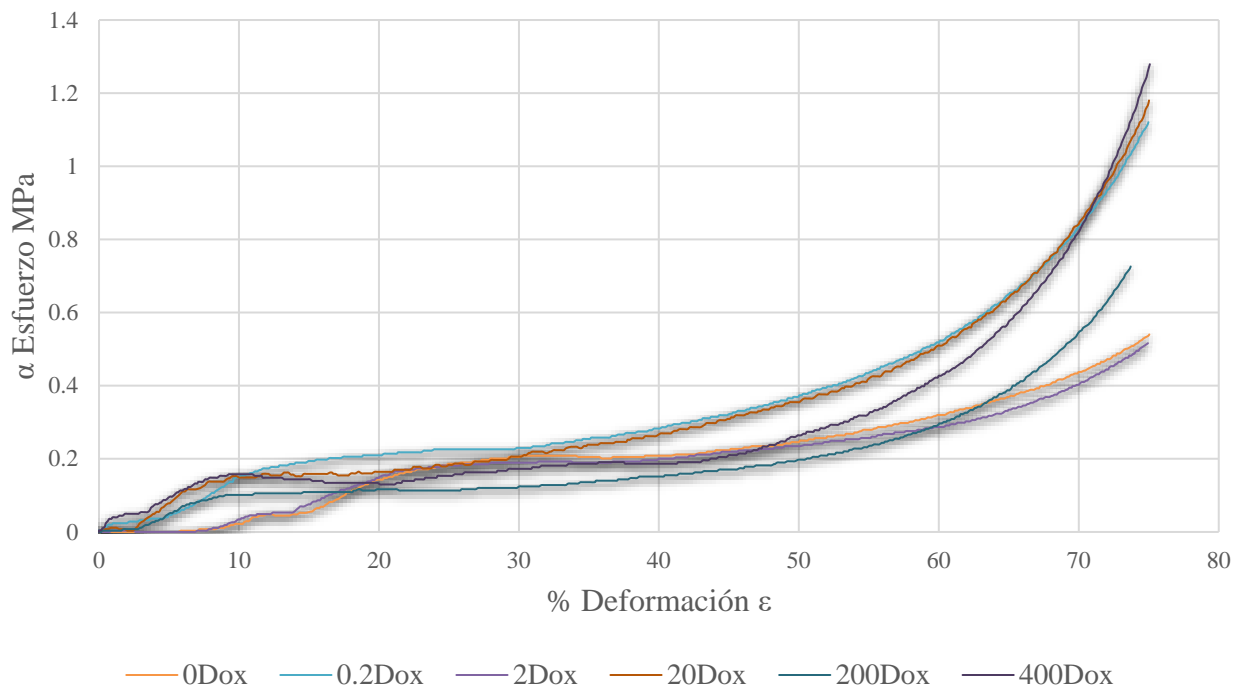


Figura 12. Resistencia a la compresión del sustituto sin doxiciclina y con las cinco concentraciones subantimicrobianas

Si se observa el nivel de esfuerzo aplicado en cada uno de los sustitutos óseos con diferentes concentraciones de doxiciclina se puede notar que las concentraciones 0,2 Dox, 20 Dox y 400 Dox soportaron los mayores esfuerzos MPa, mientras que aquellos sustitutos óseos con concentraciones de doxiciclina 2 Dox, 200 Dox y el sustituto sin doxiciclina necesitaron un menor esfuerzo para alcanzar el 75 % de deformación  $\xi$  (Figura 13).

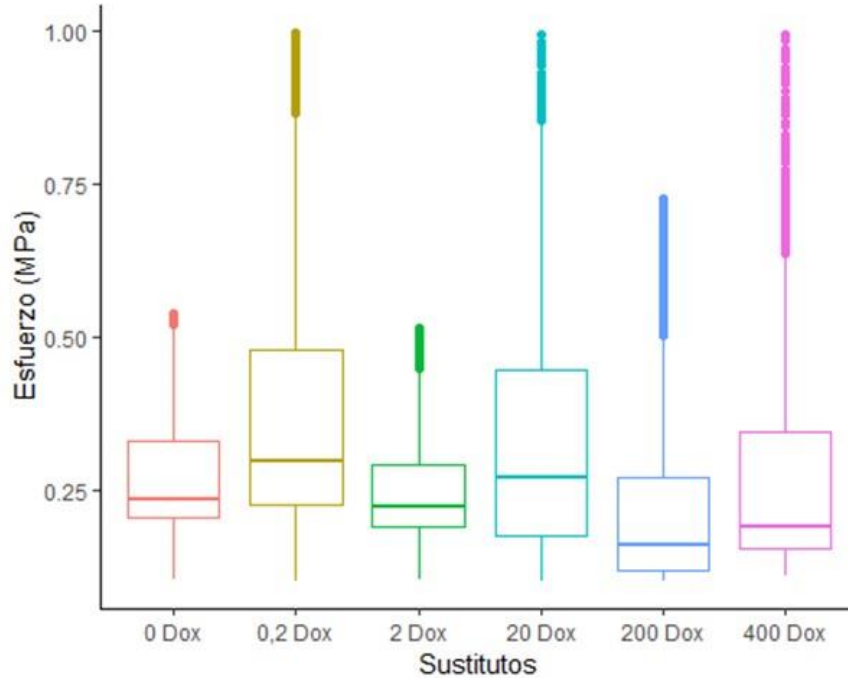


Figura 13. Diagrama de cajas y bigotes de la resistencia compresiva del sustituto sin doxiciclina y con las cinco concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato.

#### Análisis estadístico

Al realizar los residuos de este modelo ANOVA, se obtiene como resultado que no se verifica el supuesto de normalidad de los residuos, la prueba de Shapiro-Wilk (Tabla 5) indica un p-valor de  $1.378e^{-42}$ , siendo un valor inferior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de normalidad en los residuos, por lo que los resultados de este modelo ANOVA no pueden tomarse como concluyentes.

Tabla 5. Prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad de residuos para ensayo de compresión del sustituto sin doxiciclina y con las cinco concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato

Prueba estadística	Valor p
<b>0,8914</b>	<b><math>1,378e^{-42} * * *</math></b>

Al no cumplirse el supuesto de normalidad en los residuos del modelo ANOVA se emplea la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La prueba de Kruskal-Wallis no asume normalidad en los datos, en este caso, la prueba arroja un valor p de  $1,364e^{-56}$  (Tabla 6) que es inferior a un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , por lo que se rechaza la

hipótesis nula de igualdad de medias, los datos indican que la resistencia mecánica promedio fue estadísticamente diferente.

Tabla 6. Prueba de Kruskal Wallis para ensayo de compresión del sustituto sin doxiciclina y con las cinco concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato

Prueba estadística	Valor p
<b>271,5</b>	<b>1,364e<sup>-56</sup> * * *</b>

Al comparar las medias (Figura 14) se puede observar que el sustituto óseo con concentración de doxiciclina 0,2 Dox es el que posee el mayor esfuerzo promedio, seguido por las concentraciones 20 Dox y 400 Dox, mientras que los sustitutos óseos con concentraciones 2 Dox, 200 Dox y el sustituto sin doxiciclina son quienes presentan el menor esfuerzo promedio en la prueba de compresión.

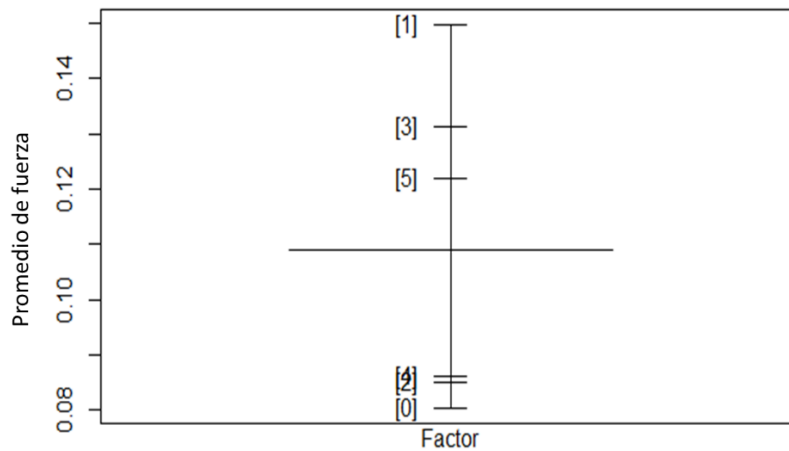


Figura 14. Comparación de medias para ensayo de compresión del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato

La determinación de la resistencia compresiva del hueso trabecular presenta muchas variables y los valores son diferentes dependiendo del sitio, edad, género, entre otros. Cesar y colaboradores en 2017 [135] reportan valores promedio de resistencia última compresiva (UCS) así:

Hueso normal (MPa):  $2,270 \pm 1,42$

Osteopenia (MPa):  $1,239 \pm 0,476$

Osteoporosis (MPa):  $0,944 \pm 0,396$

Los valores de resistencia compresiva obtenidos en este estudio corresponden con los del hueso osteoporótico, por lo que no debe usarse en zonas sometidas a cargas axiales fuertes. Sin embargo, cabe resaltar que el desempeño biomecánico del hueso es difícil de caracterizar completamente debido a su comportamiento heterogéneo, anisotrópico y viscoelástico [136].

### 5.2.2 Inyectabilidad

Sobre las jeringas empleadas en el experimento de inyectabilidad del producto, se puede observar que las jeringas vacías poseen pesos que en su mayoría se distribuyen entre 4,8646 g a 5,0359 g (Figura 15), exceptuando las dos últimas jeringas que tienden a poseer un peso bajo respecto a sus 16 antecesoras. Sin embargo, como se presentará más adelante, el peso del compuesto balanceará los pesos para garantizar una homogeneidad estadística en el experimento.

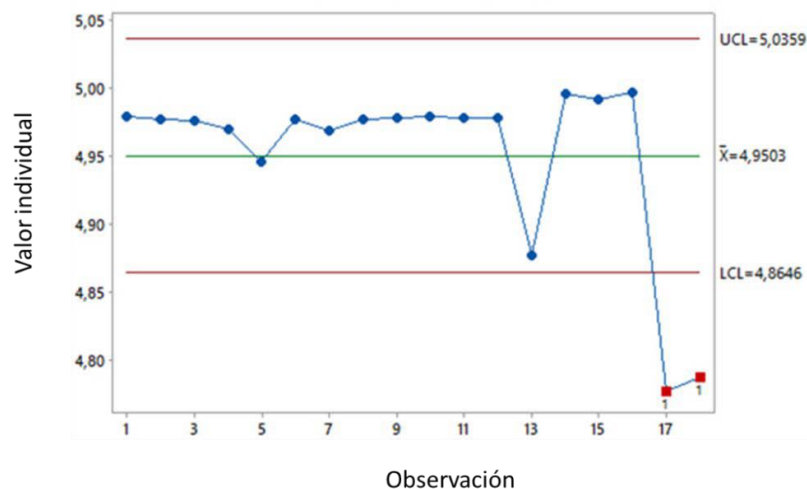


Figura 15. Control de calidad de jeringas vacías

Con referencia al peso de las jeringas con el material incorporado (jeringa llena), se puede observar que la gran mayoría de las jeringas se estabilizan entre 7,4352 g a 7,9177 g (Figura 16), con un peso promedio de 7,6765 g para las jeringas llenas, exceptuando la jeringa número 7 que tiende a estar un poco por debajo de estos límites de control del proceso de balanceo de los pesos para el experimento. Pero se puede observar que el peso del compuesto balanceó de forma efectiva los pesos entre las jeringas garantizando una homogeneidad estadística

en el experimento.

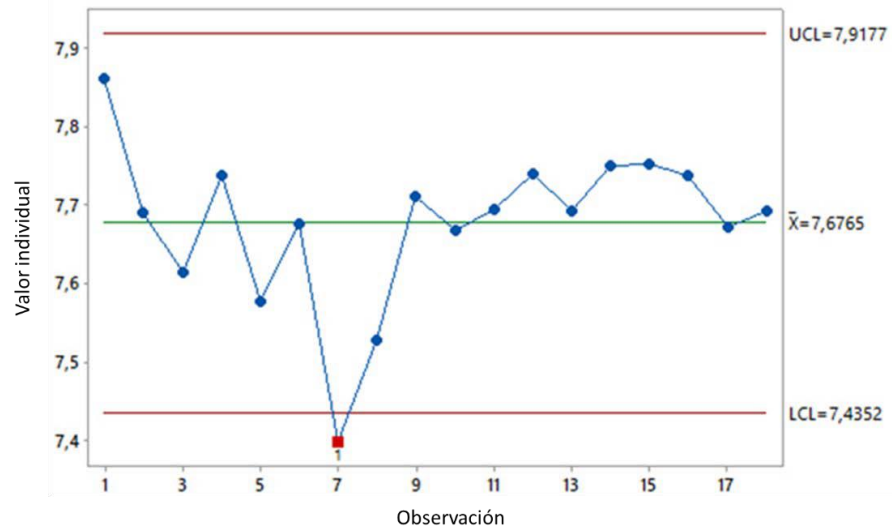


Figura 16. Observaciones de jeringas llenas

Los resultados de la prueba de inyectabilidad son mostrados en la Figura 17. Se identifican tres momentos importantes ya reportados por otros autores [137] [138] y señalados en la Figura 17 de izquierda a derecha así:

1. "Sobre-esfuerzo" o "rebasamiento": se requiere un sobreesfuerzo inicial para vencer la presión hidráulica al interior de la jeringa.
2. Plateau o meseta: esta zona indica una mayor presencia de sólidos, la meseta en este caso es amplia.
3. Máximo esfuerzo al finalizar la inyección: indica el punto de resistencia mecánica, que ejerce el émbolo contra el extremo final de la jeringa.

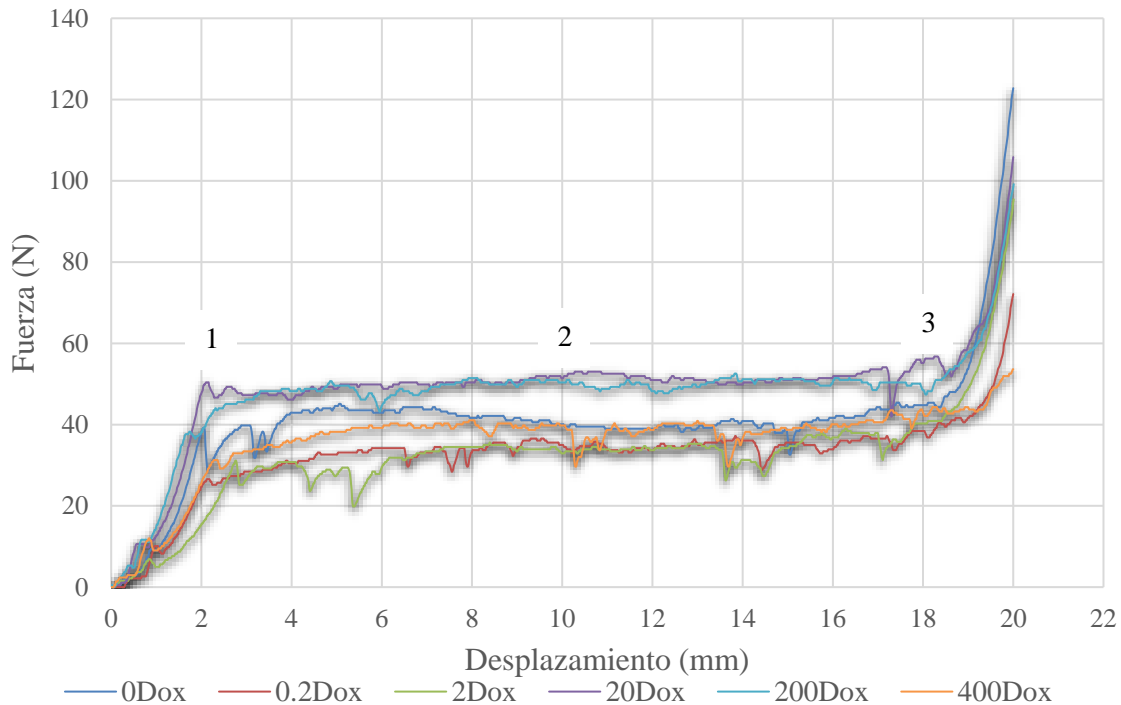


Figura 17. Comportamiento de inyección de sustitutos subantimicrobianos

Es común que entre estos materiales y la pared de la jeringa se forme una pequeña capa, por lo que la fuerza inicial necesaria para comenzar la extrusión debe vencer la energía estática y la fricción. Luego, se da un "plateau" o meseta amplia ya que la fuerza friccional dinámica de dos superficies es menor con respecto a la estática en un mismo sistema inyectable. Esto hace que la inyección en este punto requiera menos fuerza.

Con respecto a los valores necesarios para inyectar el material, se obtuvieron valores promedio de 60 N que son fácilmente alcanzables por la mano humana donde se encuentran valores entre 71,1 N y 104,7 N [32] y que coinciden con valores reportados por Neves *et al* que indican la necesidad de fuerzas menores a 100 N para inyectar este tipo de materiales [139].

También se reporta en la literatura, el fenómeno de separación de fases en materiales inyectables. Este hecho se presenta en inyectables en fase acuosa, existe un mayor contenido de agua cerca a la aguja con algunos sólidos que se precipitan y presentan una resistencia inicial a la inyección (Figura 18A) y luego el material en el cuerpo de la jeringa es un material más mixto como lo muestra la zona de succión (Figura 18B) y que explicaría el comportamiento de la gráfica. En la sección C se muestra la fase de consolidación del polvo y drenaje del líquido. Los resultados mostraron este mismo fenómeno, indicando una resistencia inicial alta, pero no mayor a la que puede aplicar la mano del cirujano, que continua con un desplazamiento suave y continuo del émbolo.



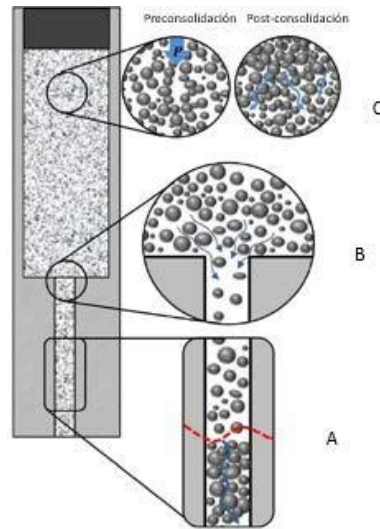


Figura 18. Fenómeno de separación de fases en material inyectable [140]

La presión también es un factor importante que se ha estudiado en materiales inyectables [141] y se ha encontrado que la presencia de agua no modifica la presión del émbolo, por lo que no sería necesario usarla en estos materiales. Por último, la facilidad de inyectar este material compuesto es una gran ventaja, ya que se puede dar la forma exacta del defecto óseo evitando las complicaciones de los injertos en bloque que presentan con frecuencia necrosis y perforación de mucosa [142].

En promedio se extruyó el 98,95 % del material (Tabla 7) en cada jeringa aplicando una fuerza promedio de 60 N. Ninguna muestra presentó porcentaje de extrusión menor a 90 %. Si se toma como referencia que Dorati [143] reportó en su estudio una inyectabilidad de 70 a 75 % como aceptable para este tipo de aplicaciones, el sustituto propuesto tiene una excelente inyectabilidad por su alto porcentaje de extrusión.

Tabla 7. Resumen del porcentaje de material extruído por contenido de dosis subantimicrobianas de doxiciclina

Nombre	Promedio de extrusión (%)	Desviación estándar
<b>0 Dox</b>	98,6994	0,63
<b>0,2 Dox</b>	98,6869	1,19
<b>2 Dox</b>	99,36.33	0,92
<b>20 Dox</b>	99,0703	0,43
<b>200 Dox</b>	99,3152	1,57
<b>400 Dox</b>	98,9325	0,76

En la Figura 19 se presenta el diagrama cajas y bigotes del porcentaje de extrusión de sustituto con y sin doxiciclina.

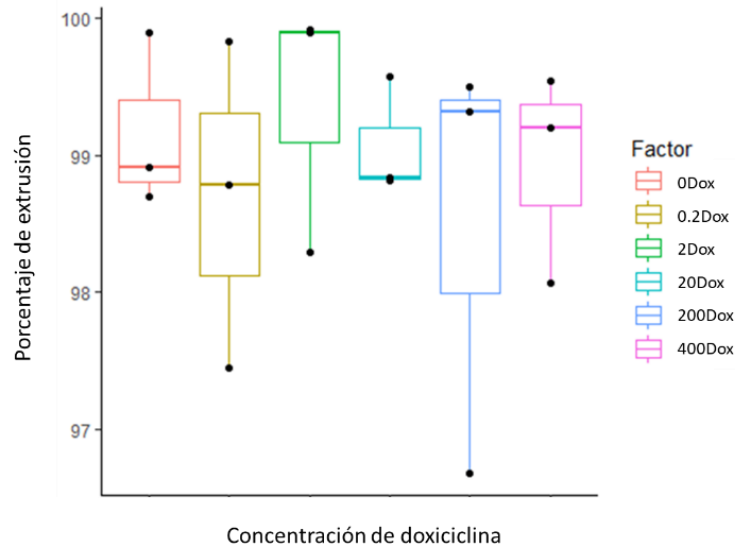


Figura 19. Diagrama cajas y bigotes del porcentaje de extrusión de sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato

Para conocer si existe un efecto significativo de los niveles de concentración de doxiciclina sobre el porcentaje de extrusión, se emplea el método estadístico del Análisis de la Varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) en el que se contrastan las hipótesis:

$$\begin{cases} H_0: \mu_{[0]} = \mu_{[1]} = \mu_{[2]} = \mu_{[3]} = \mu_{[4]} = \mu_{[5]} \\ H_1: \text{al menos un } \mu_i \neq \mu_j \text{ para todo } i \neq j \text{ con } i, j = 1, 2, \dots, 5 \end{cases}$$

La prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad en los residuos arroja un valor p de 0,3211 (Tabla 8), siendo superior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , por lo que no se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de normalidad en los residuos, es decir, los residuos del modelo ANOVA siguen una distribución normal validando así uno de los supuestos requeridos en el análisis de la varianza.

Tabla 8. Prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad de residuos para la prueba de inyectabilidad

Estadístico de prueba	Valor p
0,9426	0,3211

Respecto a la homocedasticidad de la varianza de los errores, se presenta la prueba de Levene (Tabla 9) la cual indica un valor p de 0,1872, siendo superior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , por lo que no se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de homocedasticidad en la varianza de los residuos, es decir, se valida otro de los principales supuestos del modelo ANOVA sobre la igualdad de varianzas en los residuos, indicando que los datos proporcionados por el modelo son concluyentes.

Tabla 9. Prueba de homocedasticidad para la varianza de porcentaje de extrusión (Prueba de Levene)

	Grados de libertad	Valor F	Pr(>F)
Grupo	5	1,801	0,1872
	12		

Los resultados de la tabla ANOVA (Tabla 10) arrojan un valor p de 0,8991 siendo inferior a un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , por lo que no se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias para los niveles de concentración de doxiciclina, es decir, la concentración de doxiciclina no tiene un efecto significativo sobre el porcentaje de extrusión del sustituto óseo.

Tabla 10. Análisis ANOVA para porcentaje de extrusión

	Grados de libertad	Suma cuadrada	Prom.cuadrado	Valor F	Pr(>F)
Factor	5	1,524	0,3047	0,3075	0,8991
Residuales	12	11,89	0,9911	NA	NA

Ya probadas las jeringas llenas, se pesa el material no extruido en ellas y se puede apreciar una distribución muy estable a lo largo de las jeringas. El valor promedio registrado es de 0,0286 g de material no extruido y oscilan entre las bandas 0 g y 0,128 g (Figura 20).

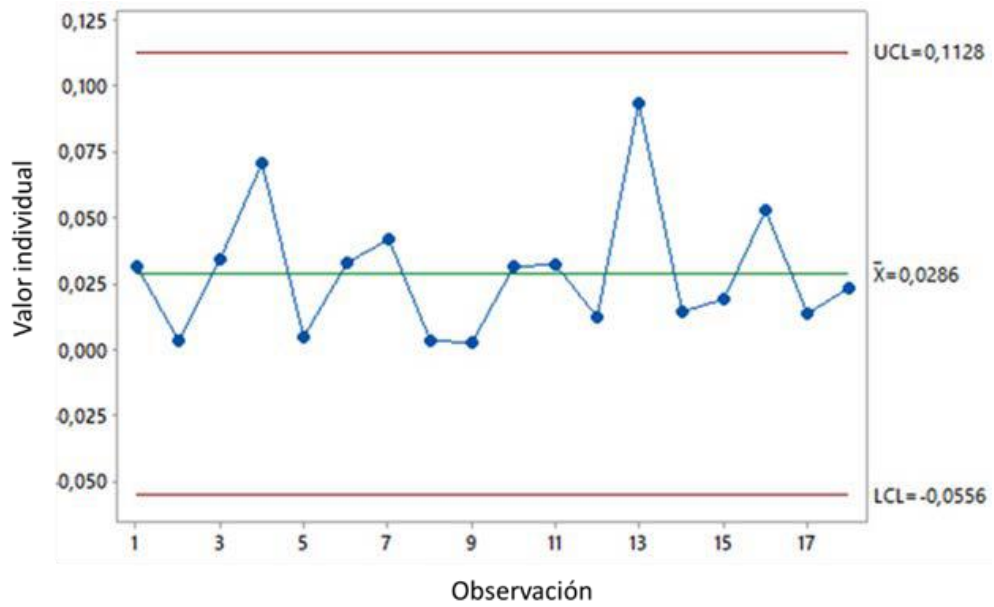


Figura 20. Gráfico para el peso de material no extruido

### 5.2.3 Cinética de degradación

Para el nivel de pH del compuesto según los niveles de concentración de doxiciclina, se observa en la Figura 21 que los niveles de pH son muy similares para las diferentes concentraciones de doxiciclina, apreciándose que la mayor variabilidad se presenta en las concentraciones de doxiciclina 0 Dox y 0,2 Dox.

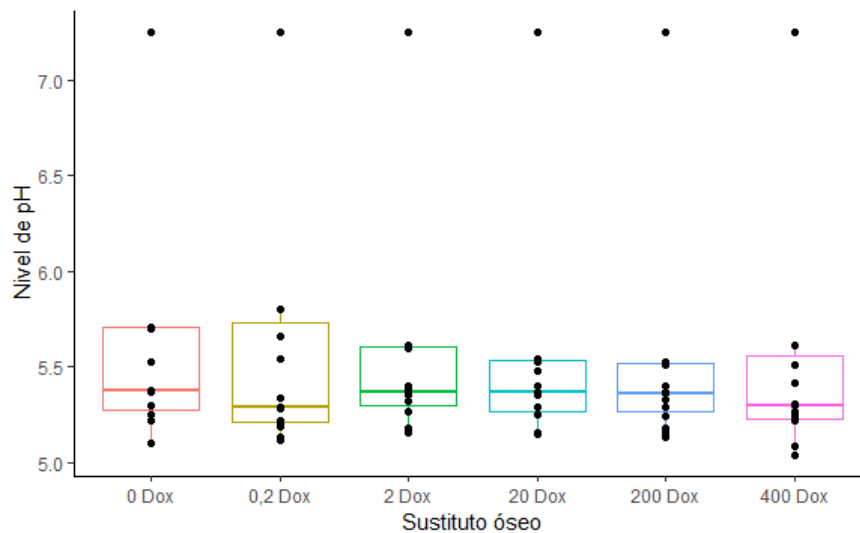


Figura 21. Diagrama cajas y bigotes de prueba de degradación (medición de pH) del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato

Comparando el nivel de pH en los días de observación pautados a un plazo de 7 días (una vez por semana), se

puede observar que la solución va aumentando su acidez a medida que avanzan las semanas, pero la caída drástica del pH se da la primera semana y luego se estabiliza (Figura 22).

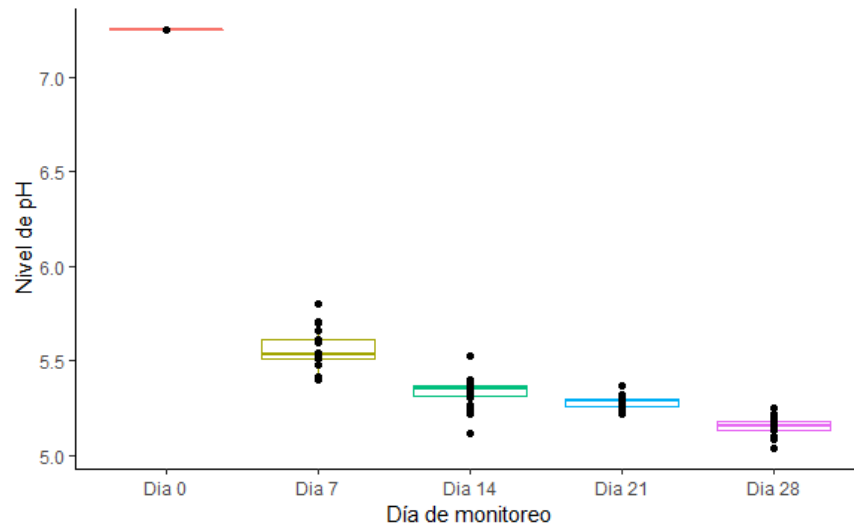


Figura 22. Diagrama cajas y bigotes de prueba de degradación, factor pH del sustituto sin doxiciclina y con las 5 concentraciones subantimicrobianas de doxiciclina hiclato

Para establecer el efecto significativo en el cambio de los niveles de pH tanto por la concentración de doxiciclina, así como el día en que se está midiendo, se empleó el método ANOVA con dos factores fijos, en el que se contrastan las hipótesis para cada factor:

Para la concentración de Doxiciclina:

$$H_0: \mu_{[0]} = \mu_{[1]} = \mu_{[2]} = \mu_{[3]} = \mu_{[4]} = \mu_{[5]}$$

$$H_1: \text{al menos un } \mu_{[i]} \neq \mu_{[j]} \text{ para todo } i \neq j$$

Para los días en que se tomaron las mediciones:

$$H_0: \mu_{Día\ 0} = \mu_{Día\ 7} = \mu_{Día\ 14} = \mu_{Día\ 21} = \mu_{Día\ 28}$$

$$H_1: \text{al menos un } \mu_{Día\ i} \neq \mu_{Día\ j} \text{ para todo } i \neq j$$

La prueba de Shapiro-Wilk (Tabla 11) para comprobar la normalidad en los residuos arroja un p-valor de 3.418e-05, siendo muy inferior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de normalidad en los residuos, es decir, los residuos del modelo ANOVA no siguen una distribución normal, por lo que los resultados de este modelo para el nivel de pH no son concluyentes al no cumplir este supuesto requerido en el análisis de la varianza.

Tabla 11. Prueba de Shapiro-Wilk para la normalidad en los residuos en el análisis de pH

Prueba estadística	Valor p
0,9196	3,418e <sup>-05</sup> *

Lo mismo ocurre con el supuesto de homocedasticidad de la varianza de los errores, para el que la prueba de Bartlett la cual indica un p-valor de 7,507e<sup>-95</sup>(Tabla 12), siendo bastante inferior a un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de homocedasticidad en la varianza de los residuos, es decir, no se cumple el supuesto de homocedasticidad en el modelo por lo que los resultados del modelo no son concluyentes para el experimento.

Tabla 12. Homocedasticidad en la varianza de los residuos en análisis de pH (prueba de Barlett)

Estadístico de prueba	Grados de libertad	Valor p
439,1	3	7,507e <sup>-95</sup> * **

Se aplica la prueba de Kruskal-Wallis ya que no hay normalidad en los datos lo que permite comparar los efectos de los factores sobre el pH de una forma más robusta. En este caso, la prueba arroja un valor p de 0,9051 indicando que no se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias por lo que la concentración de doxiciclina no posee un efecto significativo sobre el nivel de pH, mientras que el p-value 1,146e<sup>-16</sup> para días indica que estos poseen un efecto significativo en el nivel del pH, es decir, a medida que transcurren las semanas, el pH de la solución con el sustituto óseo tiende a presentar una mayor acidez (Tabla 13).

Tabla 13. Resumen de prueba Kruskal-Wallis de pH por concentración y días

	Prueba estadística	Grados de libertad	Valor p
Días	80,86	4	1,146e <sup>-16</sup> **
Concentración	1,168	5	0,9051

Adicionalmente se tomaron mediciones al pH de dos nuevas muestras del sustituto óseo en sus primeras ocho horas en la solución (Figura 23), mostrando una tendencia decreciente en el nivel del pH del sustituto óseo, obteniéndose que en promedio el pH del sustituto óseo en las primeras ocho horas en solución es de 6,23. Mientras que si se observa en términos porcentuales de disminución (variación porcentual) se encuentra que en

la primera hora el pH puede caer un 14 % respecto al pH inicial.

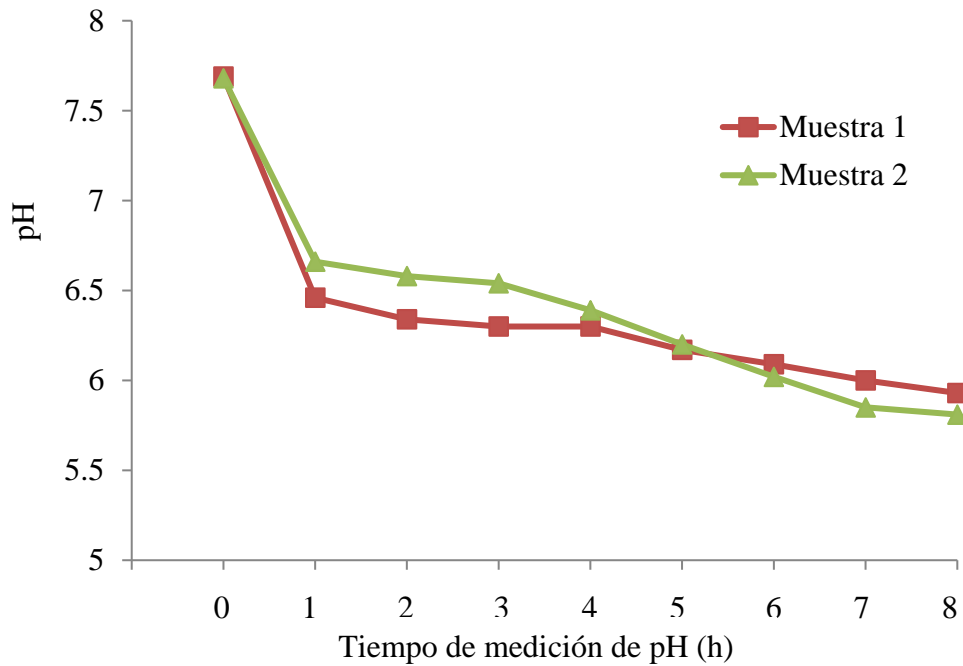


Figura 23. Comportamiento del pH en sus primeras horas del día de haber iniciado el experimento

Al extender las mediciones hacia los primeros siete días del sustituto óseo en solución, considerando 34 mediciones a lo largo de esos 7 días, se puede observar que el pH mínimo observado es de 5,31 y pH máximo es de 6,66, con un pH promedio de 5,84 y una dispersión media respecto a este valor de 0,42 (Tabla 14). Al construir el intervalo de confianza con un nivel de 95 %, se obtiene que para el intervalo de confianza el límite inferior es un pH 5,83 mientras que para el límite superior de obtiene un pH 5,85.

Es decir, que con un nivel de confianza del 95 % se puede afirmar que el verdadero pH promedio para los primeros siete días del sustituto óseo en solución se encuentra en el intervalo [5,83; 5,85], por lo que, al comparar con pH inicial de 7,68, se puede afirmar que el pH del sustituto óseo en solución pasa de un nivel básico a un pH ácido en su primera semana. Sin embargo, no puede considerarse como un hecho extrapolable completamente al medio clínico puesto que las concentraciones de bicarbonato que posee la sangre no se reproducen exactamente en las soluciones SBF porque forman grandes precipitados en estos medios. El bicarbonato es un potente buffer en la sangre que ayuda *in vivo* a controlar la caída abrupta del pH, que pueda generarse al entrar en contacto con un material.

Tabla 14. Estadísticos de resumen para la variación del pH

Estadísticas	
<b>Media</b>	5,83911765
<b>Error típico</b>	0,07205089
<b>Mediana</b>	5,66
<b>Moda</b>	5,51
<b>Desviación estándar</b>	0,42012529
<b>Coefficiente de asimetría</b>	0,50501326
<b>Rango</b>	1,35
<b>Mínimo</b>	5,31
<b>Máximo</b>	6,66
<b>Cuenta</b>	34
<b>Nivel de confianza (95 %)</b>	0,14658864

Al analizar la causa de caída del pH, se concluye que el principal factor asociado se relaciona con el fluido fisiológico simulado (SBF es la sigla usada, por su denominación en inglés). La solución SBF contiene elementos que podrían modificar el pH de la solución, como se muestra en la Figura 24. De ellos, las especies interesantes de discutir son las enmarcadas en cada recuadro azul. Tanto el bicarbonato de sodio como el fosfato ácido de potasio. Las otras especies químicas no tienen efecto sobre el pH de la solución. Además, se muestra el equilibrio químico de la autoionización del agua, en donde las concentraciones de iones  $H^+$  y  $OH^-$  se comportan de una manera inversamente proporcional, cuando aumenta la concentración de iones  $H^+$ , disminuye la concentración de iones  $OH^-$  y viceversa.



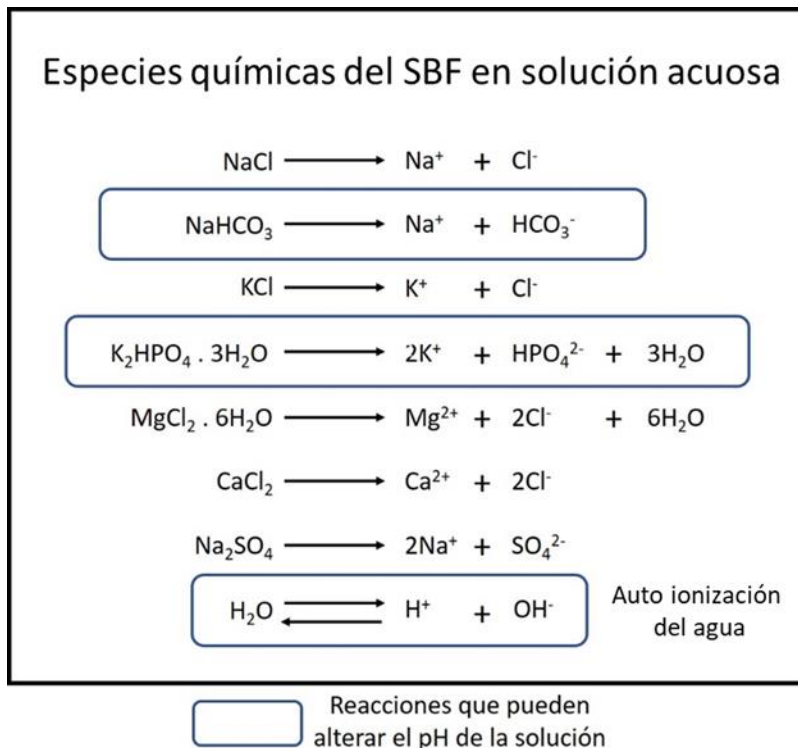


Figura 24. Especies químicas del SBF en solución acuosa. Fuente propia

La presencia de iones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) en agua lleva a la formación de carbonatos solubles ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) que luego precipitan con los iones calcio presente en la solución ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de esta forma se genera el precipitado de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) presente en la superficie de la hidroxiapatita (sustituto) como se esquematiza en la Figura 25. Además, esta reacción conlleva un consumo de iones  $\text{OH}^-$  (disminuyendo su concentración en la solución). Dicho consumo de iones  $\text{OH}^-$  conlleva necesariamente un aumento en la presencia de iones  $\text{H}^+$ , debido al equilibrio químico de la autoionización del agua. Dicho aumento de iones  $\text{H}^+$ , el cual es secundario a la precipitación de carbonato de calcio, podría explicar la disminución en el pH observado.

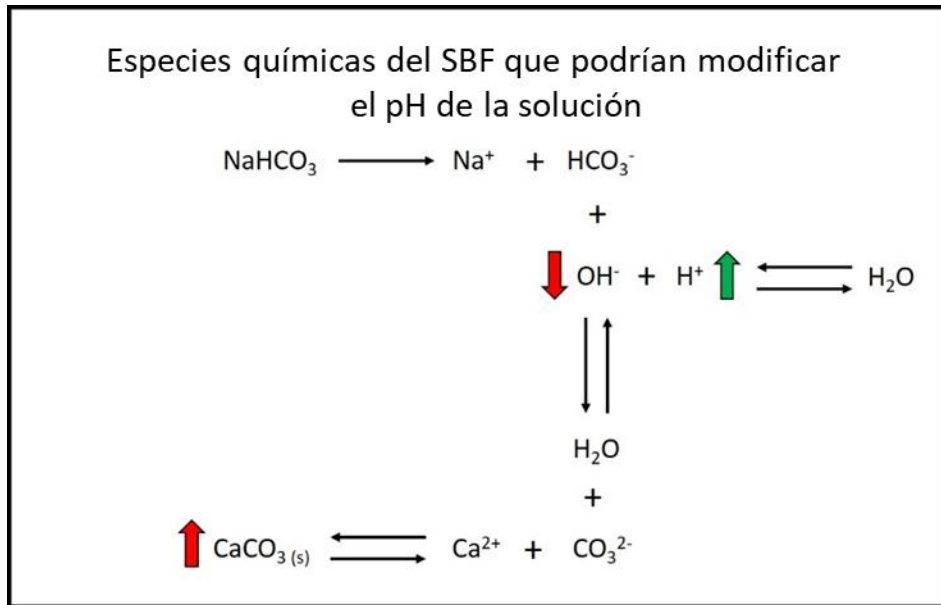


Figura 25. Esquema explicativo que muestra la disociación del bicarbonato de sodio en agua y las especies derivadas que pueden modificar el pH de la solución. Fuente propia

Otro reactivo que puede alterar el pH en estas condiciones es el fosfato ácido de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), cuando conlleva la formación de precipitados de fosfato de calcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). En solución acuosa la disolución de fosfato ácido de potasio lleva a la formación de iones potasio ( $\text{K}^+$ ) y de iones fosfato ácido ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Posteriormente, este último ion puede disociarse en fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y protón ( $\text{H}^+$ ), permitiendo la precipitación de los fosfatos con los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) presentes en la solución, de esta manera depositándose fosfato de calcio en la superficie de la hidroxiapatita como se esquematiza en la Figura 26.

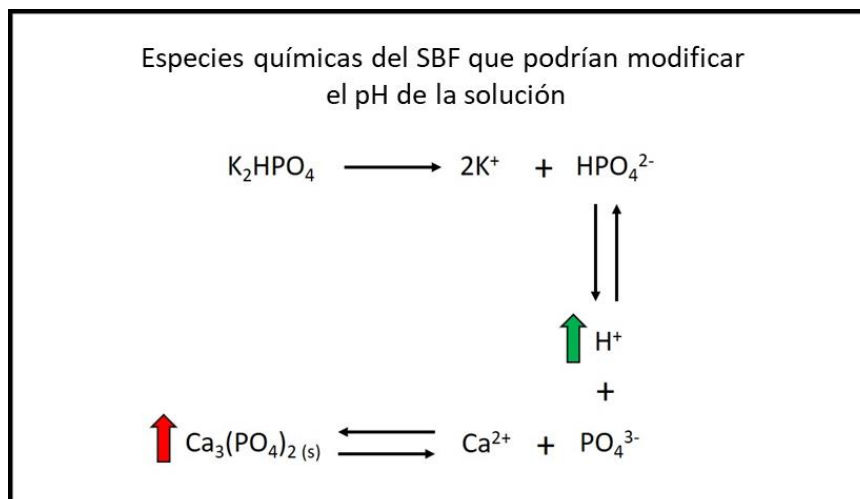


Figura 26. Esquema explicativo que muestra la disociación del fosfato ácido de potasio en agua y las especies derivadas que pueden modificar el pH de la solución. Fuente propia

De esta precipitación se genera, de forma secundaria, un aumento de iones  $H^+$  en solución, que podrían explicar un cambio en el pH observado y pueden depositarse fosfatos de Ca nuevos en la superficie que no fueron observados en el FTIR por dos razones probables: una al depositarse primero los fosfatos que los carbonatos fueron cubiertos por estos últimos; y también se pudieron formar fosfatos de Ca de la misma vibración que los de la HAp del sustituto y por lo tanto no se pudieron diferenciar como nuevos fosfatos de superficie.

En el análisis de degradación del sustituto óseo con respecto a la variación en peso, se puede observar que el peso del material húmedo presenta una distribución de pesos similar a lo largo de los niveles de concentración de doxiciclina, aunque si se aprecia una mayor variabilidad en las concentraciones 0 Dox, 200 Dox y 400 Dox (Figura 27). Para los pesos en los días de monitoreo se observa un comportamiento creciente en los pesos que tiende a estabilizarse a partir del día 14 de monitoreo, como era de esperarse por las capacidades de absorción del sustituto óseo (polímero tipo hidrocoloide).

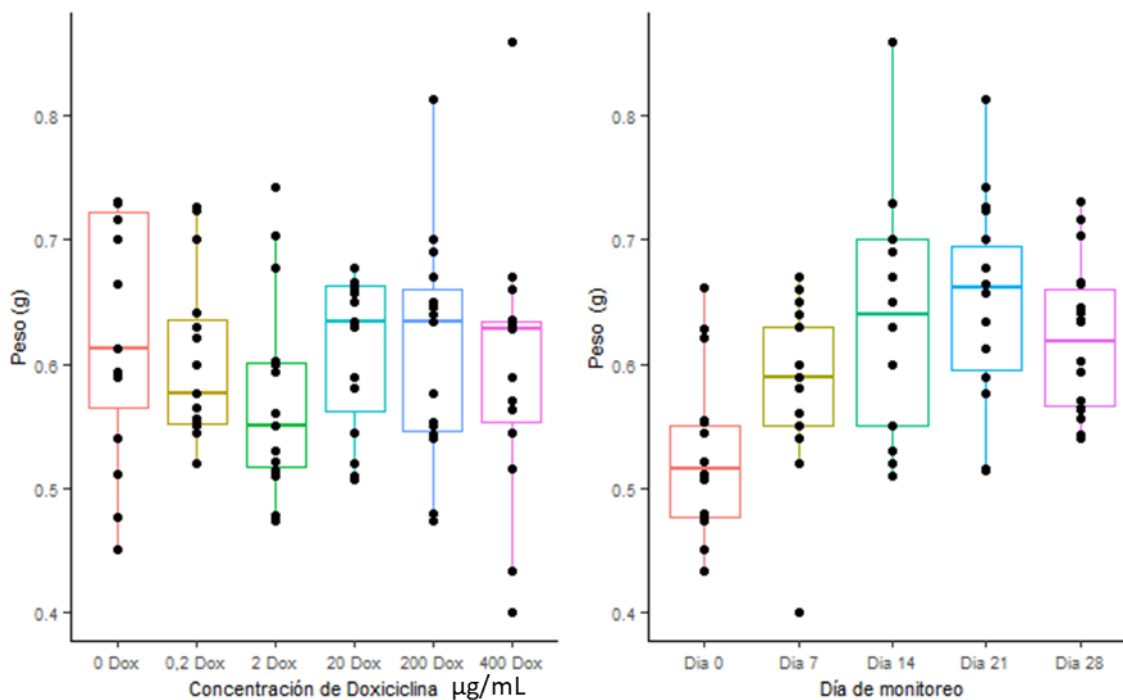


Figura 27. Diagrama cajas y bigotes de peso húmedo del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina o día de evaluación

Los resultados de la tabla ANOVA arrojan un p-valor de 0,5622 y  $1,185e^{-05}$  para la concentración de doxiciclina y el día de monitoreo, respectivamente (Tabla 15), indicando que para un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias solo para el factor 'Días', es decir, la concentración de doxiciclina no posee un efecto significativo en los cambios de peso húmedo del sustituto óseo mientras que el transcurso de los días de monitoreo posee un efecto significativo en el peso húmedo promedio del sustituto óseo siendo un efecto creciente.

Tabla 15. Resumen de ANOVA para peso húmedo en prueba de degradación

	Grados de libertad	Suma cuadrada	Prom. cuadrado	Valor F	Pr(>F)
Concentración	5	0,02189	0,004378	0,7869	0,5622
Días	4	0,1848	0,04619	8,302	$1,185e^{-05}$
Residuales	80	0,4452	0,005564		

La prueba de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad en los residuos arroja un valor p de 0,8627, siendo un valor superior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , por lo que no se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de normalidad en los residuos, es decir, los residuos del modelo ANOVA siguen una distribución normal, cumpliéndose uno de los principales supuestos requeridos en el análisis de la varianza (Tabla 16).

Tabla 16. Prueba Shapiro Wilk para degradación

Estadístico de prueba	Valor P
0,9919	0,8627

Por otro lado, el supuesto de homocedasticidad de la varianza de los errores, empleando la prueba de Bartlett indica un valor p de  $7,507e^{-95}$ , siendo inferior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de homocedasticidad en la varianza de los residuos, es decir, no se cumple el supuesto de homocedasticidad en el modelo por lo que los resultados de este modelo ANOVA para el peso húmedo no son del todo concluyentes (Tabla 17).

Tabla 17. Prueba de homocedasticidad de la varianza de peso húmedo.

Estadístico de prueba	Grados de libertad	Valor P
439,1	3	$7,507e^{-95} * * *$

La Tabla 18 corresponde a la prueba post-hoc de Tukey del análisis de la varianza, en la que se puede observar todas las posibles comparaciones entre los promedios del peso húmedo del sustituto óseo por el día de monitoreo. La columna 'diferencia' presenta la diferencia entre los promedios, las columnas 'Lim inf.' y 'Lim sup.' constituyen el intervalo de confianza del 95 % para esa diferencia de medias y además se presenta los valores p para la significancia de esas diferencias. En lo que se puede destacar que respecto al día cero (0) y día 7 de monitoreo presentan pesos húmedos iguales, mientras que los días de monitoreo 14, 21 y 28 presentan los pesos promedios más altos y son más grandes que los pesos promedio registrados los días 0 y 7, respectivamente.

Al comparar el peso promedio de los días de monitoreo 14, 21 y 28 se puede observar que el mayor peso promedio se alcanza al día 14 y es muy similar al peso alcanzado el día 21. Al evaluar el día 28, se encuentra disminución del peso.

Tabla 18. Prueba post-hoc de Tukey para variación de peso húmedo

	Diferencia	Lim inf.	Lim Sup.	Valor P
Día 7-Día 0	0,05639	-0,01301	0,1258	0,1662
Día 14-Día 0	0,1131	0,04366	0,1825	0,000182
Día 21-Día 0	0,1249	0,05549	0,1943	2,96e-05
Día 28-Día 0	0,09494	0,02555	0,1643	0,00239
Día 14-Día 7	0,05667	-0,01273	0,1261	0,1625
Día 21-Día 7	0,0685	-0,00089	0,1379	0,05478
Día 28-Día 7	0,03856	-0,03084	0,108	0,5332
Día 21-Día 14	0,01183	-0,05756	0,08123	0,9893
Día 28-Día 14	-0,01811	-0,08751	0,05129	0,9493
Día 28-Día 21	-0,02994	-0,09934	0,03945	0,7489

#### Análisis de peso seco

También se realizaron mediciones del peso del material sustituto óseo seco, en el que se presenta un comportamiento similar a cuando se tomó su peso húmedo, con distribución de pesos bastante similar a lo largo de los niveles de concentración de doxiciclina, presentando la mayor variabilidad en la concentración 400 Dox de doxiciclina (Figura 28). Mientras que, para los pesos en los días de monitoreo 14, 21 y 28 se puede observar que el sustituto óseo presenta un comportamiento decreciente en los pesos en seco del material compuesto.

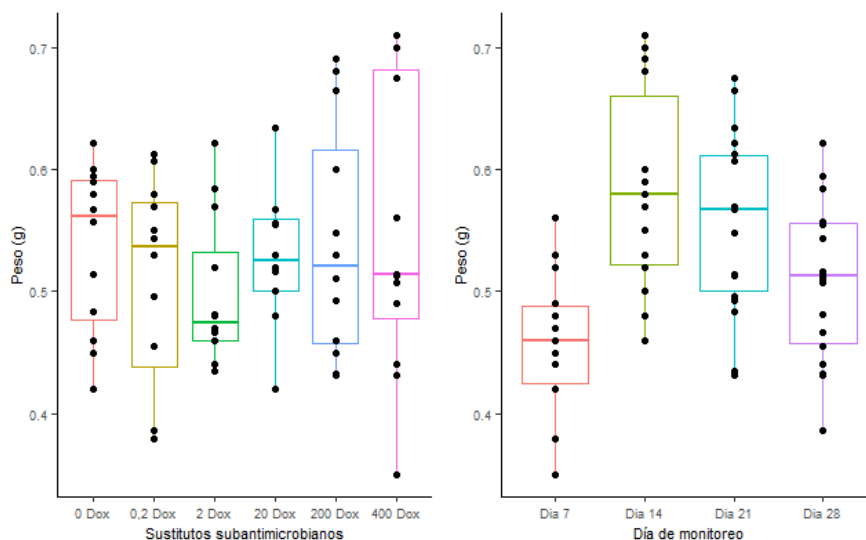


Figura 28. Diagrama cajas y bigotes del peso seco en prueba de degradación (secado a 50 °C por 50 min)

El test de normalidad de Shapiro-Wilk indica un valor p de 0,03231 (Tabla 19), siendo un valor inferior a un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de normalidad en los residuos.

Tabla 19. Test Shapiro-Wilk para la normalidad de residuos para degradación (peso seco)

Prueba estadística	Valor P
0,9629	0,03231 *

Al no cumplir los supuestos de normalidad, se recurre a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Tabla 20) para cada uno de los factores la concentración de doxiciclina y el día de monitoreo respecto a los pesos en seco del material. Donde la prueba arroja un p valor de 0,8058 y  $2,915e^{-05}$  para la concentración de doxiciclina y el día de monitoreo, respectivamente. Indicando que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias solo para el factor 'Días', por lo que la concentración de doxiciclina no posee un efecto significativo en los cambios de peso seco del sustituto óseo mientras que el transcurso de los días de monitoreo posee un efecto significativo en el peso seco promedio del sustituto óseo siendo un efecto decreciente.

Tabla 20. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis para degradación (peso seco)

	Estadístico de prueba	g l	Valor p
Concentración	2,303	5	0,8058
Días	23,68	3	2,915e-05 * * *

La variación en el peso de la muestra esta relacionada con los depósitos que pueden darse en la superficie del sustituto producto de las interacciones con los iones, que además generan cambios en pH, tal como se explico en el ítem anterior. Además, como se verá a continuación el sustituto presenta bioactividad lo que genera al estar inmerso en SBF, formación de capas de apatita carbonatada.

#### 5.2.4 Bioactividad

Las micrografías SEM de los sustitutos evaluados en SBF son mostradas en las Figuras 29 a 31. Se puede observar cómo se presenta una capa depositada luego de la inmersión, que se detecta al comparar con la imagen del sustituto sin inmersión (Figura 29).

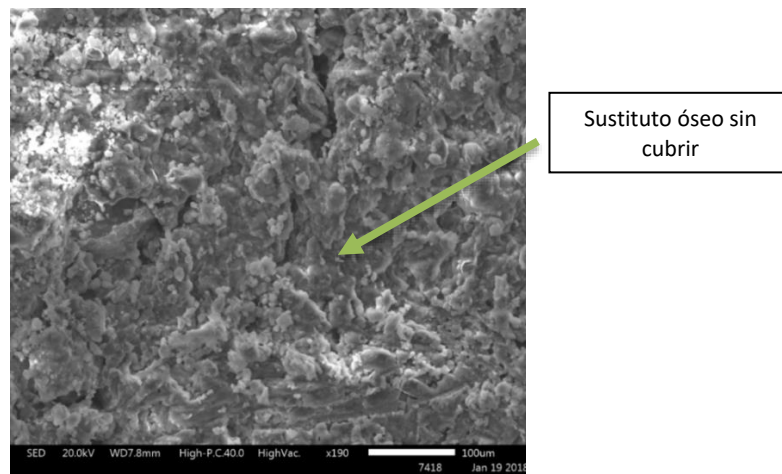


Figura 29. Control sustituto óseo no sumergido en SBF

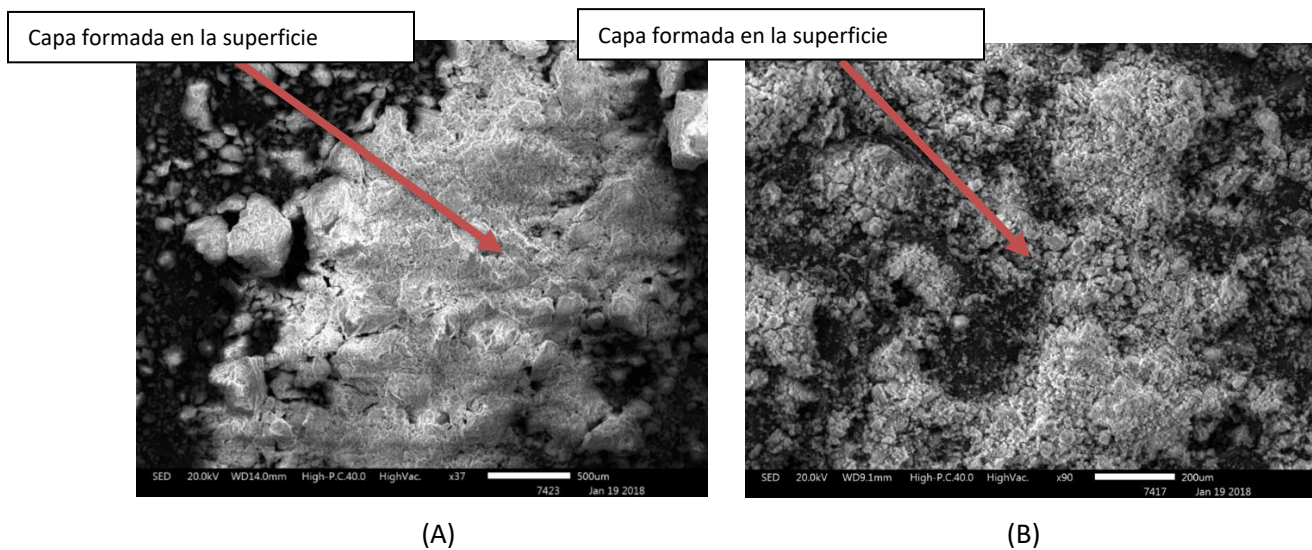


Figura 30. Sustituto óseo en SBF 3 días A. sin doxiciclina B. Con doxiciclina subantimicrobiana (0,2µg/mL)

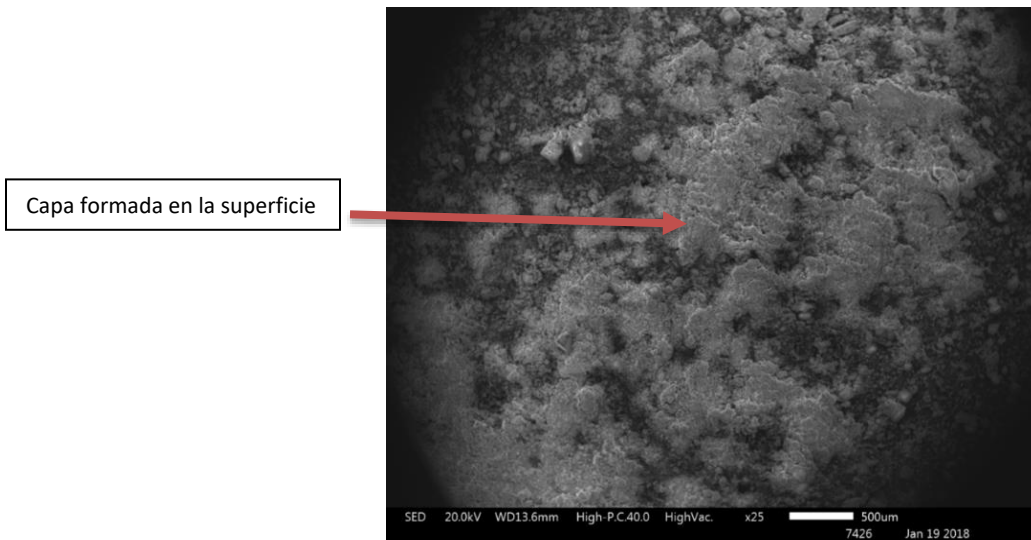


Figura 31. Sustituto doxiciclina subantimicrobiana (0,2µg/mL) 7 días en SBF

“La bioactividad de un material óseo sustituto hace referencia a su capacidad de integrarse al tejido óseo mediante la formación espontanea sobre su superficie de una capa biológicamente activa de apatita tipo ósea” [112]. Esta bioactividad suele evaluarse como la capacidad de formación de apatita sobre la superficie de un material inmerso en fluido corporal simulado (SBF), una solución con una concentración iónica similar a la del plasma sanguíneo humano (Kokubo y Takadama, 2006; Sun et al., 2006; Fathi et al., 2008; García, 2004). Por lo tanto, la formación de una capa superficial en ambos tiempos, sugiere una bioactividad del material; según la prueba de bioactividad de Kokubo. Esta prueba, sin embargo, no es concluyente y puede debatirse. La evaluación por EDX de las capas (Figura 32) muestra la presencia de calcio y fósforo que componen la hidroxiapatita. No obstante, se hace un FTIR para evaluar si la capa formada proviene de la inmersión o del material que constituye del sustituto.

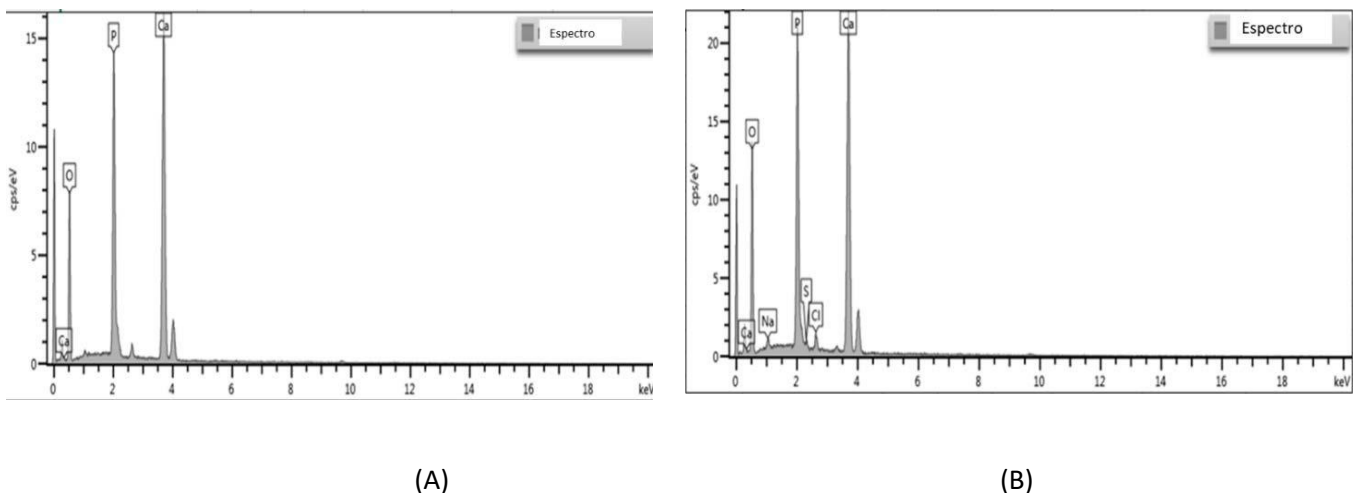


Figura 32. EDX del material compuesto sumergido en SBF durante A. 3 días, B. 7 días



Se observa en el espectro ATR-FTIR (Figura 33) una nueva vibración en el espectro infrarrojo en la región de 1680  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondería a la formación de una capa bioactiva con carbonatos depositados en la superficie.

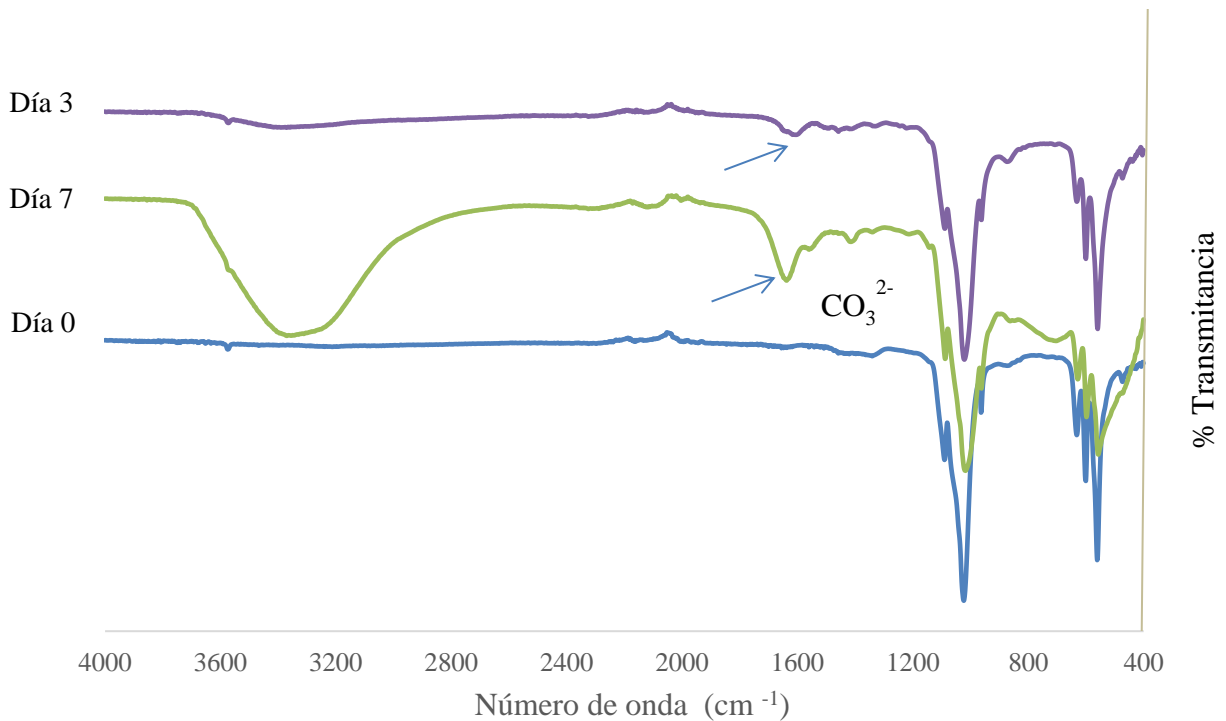


Figura 33. Bioactividad de los sustitutos óseos evaluada a través de ATR-FTIR

La literatura es extensa en investigaciones que se apoyan en la prueba *in vitro* de bioactividad de Kokubo para poder sugerir dicho comportamiento *in vivo* para este tipo de materiales. Zadpoor y colaboradores en 2014 revisan la literatura y encuentran que: en 25 de los estudios revisados, la actividad *in vitro* podía predecir la bioactividad *in vivo*, en 8 de los estudios revisados, no se logró dicha predicción [144].

La formación de carbonatos con esta prueba ha sido reportada principalmente para vidrios bioactivos. Al realizar la prueba de bioactividad de Kokubo y luego haciendo espectroscopía infrarrojo o DRX se puede detectar la formación de carbonato de hidroxapatita (HCA) a partir de estos materiales [145].

La importancia de esta bioactividad, es resaltada por Hench, uno de los principales investigadores de los mecanismos de formación de capas bioactivas, quien señaló que: “Un material bioactivo se puede unir a los tejidos duros y blandos, así como inducir mecanismos celulares, tales como, realzar la actividad osteoblástica” [146].

Esta prueba, sin embargo, no puede considerarse concluyente, sólo sugiere bioactividad. Algunos autores inclusive, señalan que esta prueba al ser acelular no representa lo que pasa en el proceso celular de bioactividad y que puede deberse a una deposición o precipitación normal de un mineral en un medio acuoso, por acción de la composición y el tiempo sin mediar necesariamente un proceso completo de formación de capa mineral neoformada [147].

### 5.2.5 Actividad antibacteriana

#### Bacteria *Porphyromonas gingivalis*

En el diagrama de cajas y bigotes se presentan los diferentes niveles de concentración empleados (Figura 34), donde se puede destacar las concentraciones de doxiciclina 0,2 Dox, 2 Dox, 20 Dox, 200 Dox y 400 Dox, no presentan halos de inhibición bacteriana por lo que se excluirán de la comparación del modelo antibacteriano y se confirma que las concentraciones consideradas como subantimicrobianas en efecto lo son. Siendo los halos de concentración de doxiciclina 0 Dox, 800 Dox, 4000 Dox y 50000 Dox los que si presentan valores de inhibición para la bacteria *P. gingivalis*.

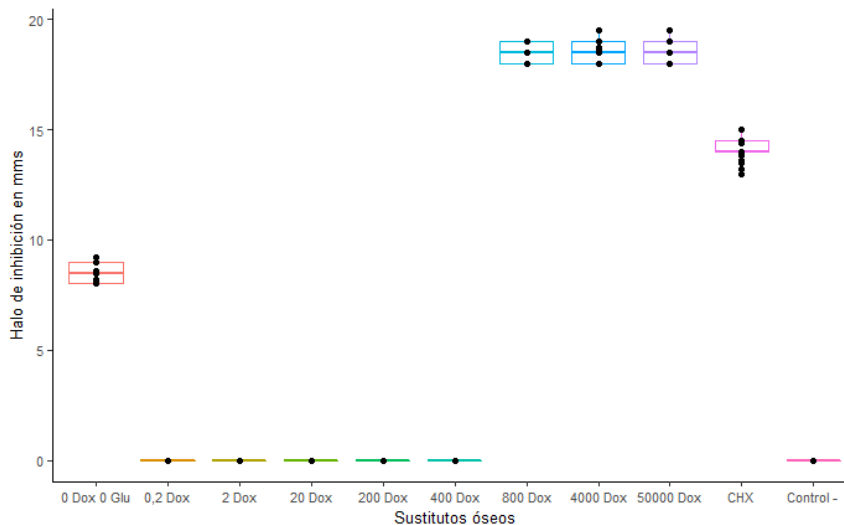


Figura 34. Diagrama cajas y bigotes del efecto antibacteriano en la bacteria *P. gingivalis* del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina

Se puede observar que los diámetros de inhibición con concentración de doxiciclina 800 Dox, 4000 Dox, 50000 Dox presentan el mismo nivel de inhibición en los halos superando incluso la inhibición bacteriana que produce la CHX, mientras que el halo del sustituto 0 Dox presenta una inhibición leve con respecto a la clorhexidina. Tal efecto puede asociarse al glutaraldehído usado como entrecruzante (ver experimento en *E. coli* donde se probó el sustituto sin glutaraldehído, (Figura 35).

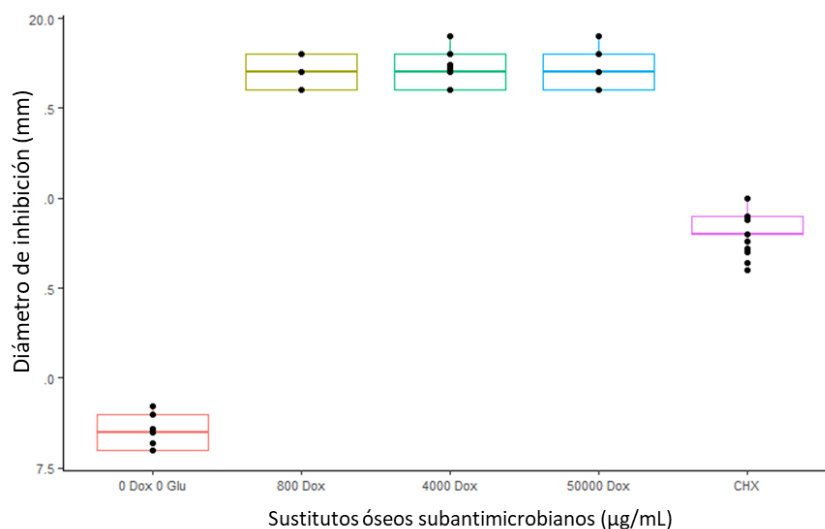


Figura 35. Diagrama cajas y bigotes del efecto antibacteriano del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina antibacteriana. Se comparan sólo las formulaciones que demostraron halo de inhibición antimicrobiana

Al evaluar la significancia de la concentración de doxiciclina y la clorhexidina (CHX), el modelo ANOVA arroja un valor p de  $1,852e^{-167}$  que respecto a un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  es muy valor p muy inferior por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias para el factor de la concentración de doxiciclina y la clorhexidina (CHX), es decir, que dichos niveles del factor tienen un efecto significativo en la inhibición de halo observados en las cajas del experimento de antibacteriano para la bacteria *P.gingivalis* (Tabla 22).

No se estudió el efecto de la tetraciclina sola ya que está comprobada en la literatura su acción antibacteriana (no es el objetivo del trabajo) y para que los resultados sean comparables entre grupos deben utilizarse las mismas densidades y presentaciones, es decir, no debe compararse polvos con líquidos, o cremas con polvos. Por lo tanto, estudiar la doxiciclina sola (en polvo) no sería comparable con ningún otro grupo.

En las diferencias de promedio en los halos según las concentraciones de los niveles de tratamiento (Tabla 23), se puede observar que el diámetro de inhibición del sustituo 0 Dox efectivamente es quien presenta la menor inhibición promedio para la bacteria *P. gingivalis* dentro de este grupo, mientras que la concentración de doxiciclina 800 Dox, 4000 Dox y 50000 Dox no son significativamente diferentes entre ellas, pero sí presentan diámetro de inhibición superior a la clorhexidina (CHX) mostrando el mayor efecto antibacteriano en estas concentraciones.

El test de normalidad de Shapiro-Wilk indica un valor p de  $3,233e^{-08}$ , siendo un valor inferior a un nivel de

significancia de  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de normalidad en los residuos, es decir, los residuos para los efectos antibióticos en la bacteria *P. gingivalis* no siguen una distribución normal estándar.

Tabla 21. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para *P. gingivalis*.

Prueba estadística	Valor p
0,9221	3,233e <sup>-08</sup> * * *

Al no cumplir los supuestos de normalidad para un modelo ANOVA, se recurre a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Tabla 23). La prueba de Kruskal-Wallis arroja un valor p de 5,344e<sup>-37</sup> lo cual indica que se debe rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias, por lo que en la comparación del nivel de inhibición microbiana promedio de la concentración de doxiciclina en 0 Dox, 800 Dox , 4000 Dox , 50000 Dox y el sustituto óseo con la clorhexidina (CHX) muestra que al menos un par de medias son diferentes, por lo que hay un efecto significativo en la inhibición de halo observados en las cajas del experimento de antibacteriano para la bacteria *P. gingivalis* en al menos uno de los niveles del factor.

Tabla 22. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis para *P. gingivalis*

Estadístico de prueba	gl	Valor p
167	2	5,344e-37 * * *

Tabla 23. Prueba de Tukey para comparación de medias según diámetro de inhibición del experimento

	Diferencia	Lim inf.	Lim Sup.	Valor p
Di 800 Dox-Di 0 Dox	10,08	9,796	10,37	0
Di 4000Dox-Di 0Dox	10,05	9,763	10,34	0
Di 50000Dox-Di 0Dox	10,14	9,852	10,43	0
CHX-Halo 0Dox	5,625	5,338	5,912	0
Di 4000Dox-Di 800Dox	-0,03333	-0,3204	0,2537	0,9977
Di 50000 Dox- Di 800Dox	0,05556	-0,2315	0,3426	0,9838
CHX-Di 800 Dox	-4,458	-4,745	-4,171	0
Di 50000Dox-Di 4000Dox	0,08889	-0,1982	0,3759	0,9132
CHX-Di 4Dox	-4,425	-4,712	-4,138	0
CHX-Di 50Dox	-4,514	-4,801	-4,227	0

Di= Diámetro de inhibición

Desde hace más de 30 años, autores como Mombelli y Sato [148] [149] demostraron que sitios periodontales que persistían con sangrado, a pesar de la instrumentación manual rigurosa, mostraban recuentos altos de *Prevotella intermedia*, *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*; mientras que en los grupos que tuvieron administración local de doxiciclina mejoraron estas variables clínicas manteniendo una concentración de 148 µg/mL hasta el día 7 de aplicación local. La concentración salivar al día siguiente de su aplicación en los estudios mencionados fue muy baja [148] [149], mientras que en la sangre fue casi imperceptible; sugiriendo una baja toxicidad y poco o ningún efecto colateral. Es decir, que con los grupos 0,2 Dox, 2 Dox, 20 Dox, y 200 Dox evaluados en este proyecto, se logra un efecto antimicrobiano que podría mejorar los parámetros clínicos periodontales sin asociación de riesgo para el paciente.

Considerando que en la literatura se reporta que la concentración mínima inhibitoria de la doxiciclina sobre *Porphyromona gingivalis* es 0,125 µg/mL [150] y en el experimento aquí reportado solo se obtuvieron halos de inhibición a partir de 800 µg/mL, puede pensarse que el polímero y el cerámico enmascaran o inhiben en cierta medida la acción netamente antibacterial (inhibición en la subunidad ribosomal 30S). Esto puede deberse a que la acción demostrada en las tetraciclinas depende principalmente a su unión a los cationes, si otras moléculas como el polímero o el cerámico intervienen pueden acoplarse a las tetraciclinas evitando su acción sobre el sustrato.

En cuanto a los halos de inhibición obtenidos en las mayores concentraciones de doxiciclina (800 Dox, 4000 Dox y 50000 Dox), se pueden comparar con los obtenidos por Ramírez-Agudelo, que observaron halos de 25 mm cuando está la doxiciclina mezclada con diferentes polímeros y de 13,8 mm cuando está libre [151].

Adicionalmente, la investigación de Martínez Rivera [152], reporta una asociación directa entre los niveles *P. gingivalis* y artritis reumatoidea, puede considerarse que una concentración microbiana de doxiciclina ayudaría en doble vía al control de la artritis, tanto por la reducción del recuento bacteriano como por la acción inmunomoduladora de las MMPs que son comunes a las dos patologías; y que han sido bien referenciadas a lo largo de este texto. Si bien no han sido completamente dilucidados los mecanismos de esta relación, se hipotetiza que: “Esta bacteria secreta una enzima, peptidil-arginina deiminasa, que es capaz de citrulinar proteínas del hospedero y así favorecer una respuesta autoinmune” [152].

En este mismo sentido, la investigación reciente de Grenier describe como concentraciones entre 0,00975 µg/mL y 10 µg/mL inhiben las proteasas de la bacteria [153], lo que sugiere un efecto antiproteolítico adicional al obtenido sobre las proteasas mamarias, concentraciones que para este estudio serían las denominadas 0,2

Dox y 2 Dox.

Teniendo en cuenta que se reportan concentraciones de doxiciclina de 148 µg/mL en el surco hasta el día 7 de aplicación local [154], la propuesta de evaluar concentraciones subantimicrobianas estarían dentro del rango y considerando que para la acción antiproteasa bacteriana de la doxiciclina sobre *P.gingivalis* son suficientes 0,156 µg/mL, se puede concluir que respecto a la acción antiMMPS mamarias de la doxiciclina y antiproteasas bacterianas de la *P. gingivalis* son suficientes las cuatro primeras formulaciones de esta investigación entre 0,2 y 200 µg/mL, que corresponden a 0,2 Dox, 2 Dox, 20 Dox y 200 Dox.

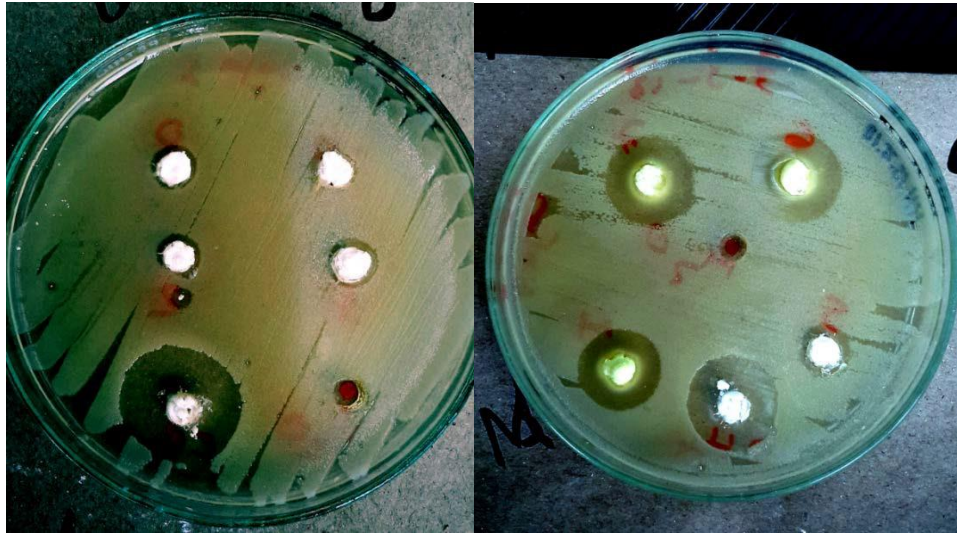
Paradójicamente, la clorhexidina que es usada como potente antibiótico (de hecho es el *gold standard* para control positivo de las investigaciones antimicrobianas incluyendo la presente), y que también se sugiere como medicamento de acción antibacteriana que no produce resistencia como los demás, presentó en el mismo estudio de Granier [153], una lisis mayor de la gelatina de prueba, asociada posiblemente al hecho de que al matar la célula bacteriana, ésta libera todas esas proteasas contenidas en su interior. Por lo tanto, el uso de dosis subóptimas de doxiciclina tiene un mejor efecto contra las proteasas bacterianas, por mecanismos no directamente bactericidas sino por un emergente camino de la inmunomodulación en la regeneración de tejidos [155].

Por otro lado, concentraciones entre 2 y 10 µg/mL de doxiciclina inhiben la amplificación que produce la *P. gingivalis* en el inmunorreceptor proinflamatorio TREM-1, por lo que estaría hablando de una acción antiinflamatoria de la doxiciclina a tan bajas concentraciones, y en adición a la acción antimicrobiana y antiproteolítica [156].

Es importante resaltar que pacientes que reciban implantes de oseointegración con altos recuentos de *P. gingivalis* previos, pueden perder los implantes [157] y si bien sería conveniente erradicar la bacteria del sitio quirúrgico previamente, en muchas ocasiones existe una necesidad de realizar exodoncia e implantación de forma concomitante, por lo que el uso de sustitutos óseos con doxiciclina en el gap implante–hueso se hace más que conveniente.

Bacteria *E. coli*

Las fotografías de los agares para la evaluación de los sustitutos usando *E. coli* ATCC 25922 se presentan en la Figura 36. El diagrama de cajas y bigotes del efecto antibacteriano en la bacteria *E. coli* del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina se puede observar en la Figura 37.



(A)

(B)

Figura 36. Agar para *E. coli* con A. sustitutos subantimicrobianos, B. sustitutos antimicrobianos

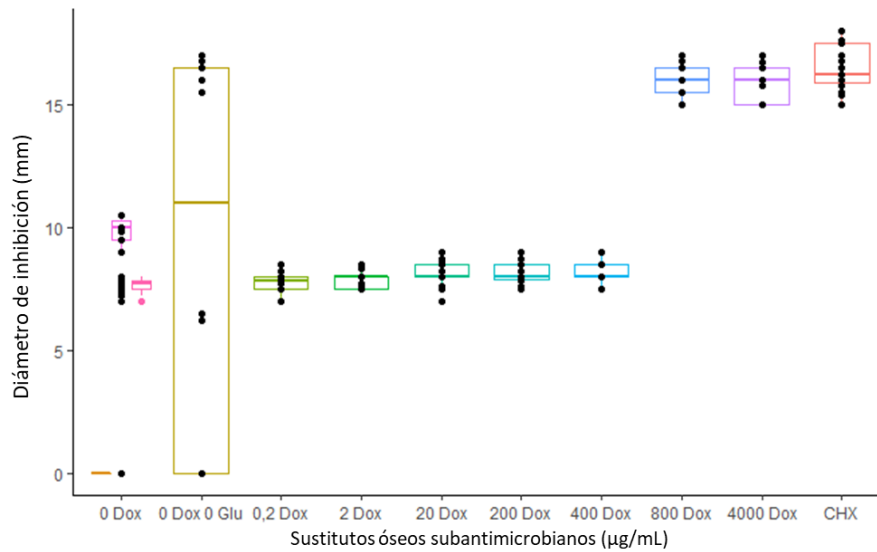


Figura 37. Diagrama cajas y bigotes del efecto antibacteriano en la bacteria *E. coli* del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina

El test de normalidad de Shapiro-Wilk indica un valor p de  $5,444e^{-12}$ , siendo un valor inferior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de normalidad en los residuos, es decir, los residuos del modelo ANOVA para los efectos antibióticos en la bacteria de *E. coli* no sigue una distribución normal (Tabla 24).

Tabla 24. Prueba normalidad en residuos para prueba antimicrobiana en *E. coli*

Estadístico de prueba	Valor P
0,8408	5,444e <sup>-12</sup> * * *

Dado que no se cumple con el supuesto de normalidad en los datos, recurre nuevamente a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Tabla 25). La prueba arroja un valor p de 5,344e<sup>-37</sup> por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias para el factor de la concentración de doxiciclina y la clorexidina (CHX), es decir, que existe un efecto significativo en alguna de las concentraciones empleadas para la inhibición de halo observados en las cajas del experimento de antibacteriano para la bacteria *E. coli*.

Tabla 25. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis para *E. coli*

Estadístico de prueba	gl	Valor p
51,29	4	1,938e-10 * * *

Las pruebas post-hoc de Tukey (Tabla 26) para conocer la diferencia de promedio de los tratamientos se presentan en la siguiente tabla, en la que se puede observar que los halos 0 Dox 0 Gluta y 800 Dox presentan una inhibición promedio inferior a la CHX, sin embargo, estos tratamientos en promedio logran alcanzar el 24 % y 37 % del poder de inhibición del CHX, respectivamente. Por otro lado, las concentraciones de doxiciclina de 4000 Dox y 50000 Dox no son significativamente diferentes al CHX lo que indica que poseen el mismo efecto antibacteriano que el CHX.

Tabla 26. Prueba Tukey para comparación de medias de experimento en *E. coli*

Comparación	Diferencia	Intervalo de confianza al 95 %		p valor
		Límite inferior	Límite Superior	
0 Dox 0 Glu-0 Dox	-1,328	-4,394	1,738	0,7541
800 Dox-0 Dox	6,167	2,626	9,707	3,474e <sup>-05</sup>
4000 Dox-0 Dox	6,1	2,56	9,64	4,346e <sup>-05</sup>
CHX-0 Dox	6,678	3,138	10,22	5,894e <sup>-06</sup>
800 Dox-0 Dox 0 Glu	7,494	4,429	10,56	2,753e <sup>-09</sup>
4000 Dox-0 Dox 0 Glu	7,428	4,362	10,49	3,79e <sup>-09</sup>



CHX-0 Dox 0 Glu	8,006	4,94	11,07	2,269e <sup>-10</sup>
4000 Dox-800 Dox	-0,06667	-3,607	3,474	1
CHX-800 Dox	0,5111	-3,029	4,051	0,9946
CHX-4000 Dox	0,5778	-2,962	4,118	0,9914

En pacientes con periodontitis se ha encontrado una alta prevalencia de enterobacterias, en Colombia en un 36 % de los casos estudiados de manifestaciones agresivas [158] y en el 1,6 % de los conductos en endodónticos infectados [159]. La tasa de proliferación es alta, en cortos periodos de tiempo y de difícil erradicación. Si bien es una bacteria que hace parte de la flora gastrointestinal normal, se han presentado casos incluso de osteomielitis maxilar asociada a esta bacteria y a la bacteria *E. faecalis* en pacientes por lo demás sanos [160].

Los halos de inhibición reportados en la literatura para concentraciones de 50 µg/mL de doxiciclina son alrededor de 32 y 35 mm [161], si bien son mayores que los obtenidos en este experimento, son solo indicativo pues no pueden extrapolarse exactamente.

La mejor comparación de la prueba de sensibilidad antimicrobiana de la prueba de difusión en agar por troquel es intraexperimento siguiendo las guías de la CLSI (Standard M02), por medio de las cuales se da una ponderación cualitativa de susceptible, intermedio o resistente [134]. Según los criterios de interpretación del suplemento M100S25 de la CLSI, se considerará susceptible un halo mayor o igual a 20 mm, intermedio entre 15 a 19 mm y resistente 14 mm [134]. Por lo tanto, la doxiciclina en el sustituto óseo evaluado se comportó entre intermedio y susceptible para ambas bacterias evaluadas a concentraciones superiores a 800 µg/mL.

#### 5.2.6 Citotoxicidad

Los resultados de la evaluación de citotoxicidad por MTT se presentan en la Figura 38. Se observa que todos tuvieron valores superiores al 75 %, mostrando así un efecto de ausencia de toxicidad celular. El diagrama de cajas y bigotes para estos resultados se presenta en la Figura 39.

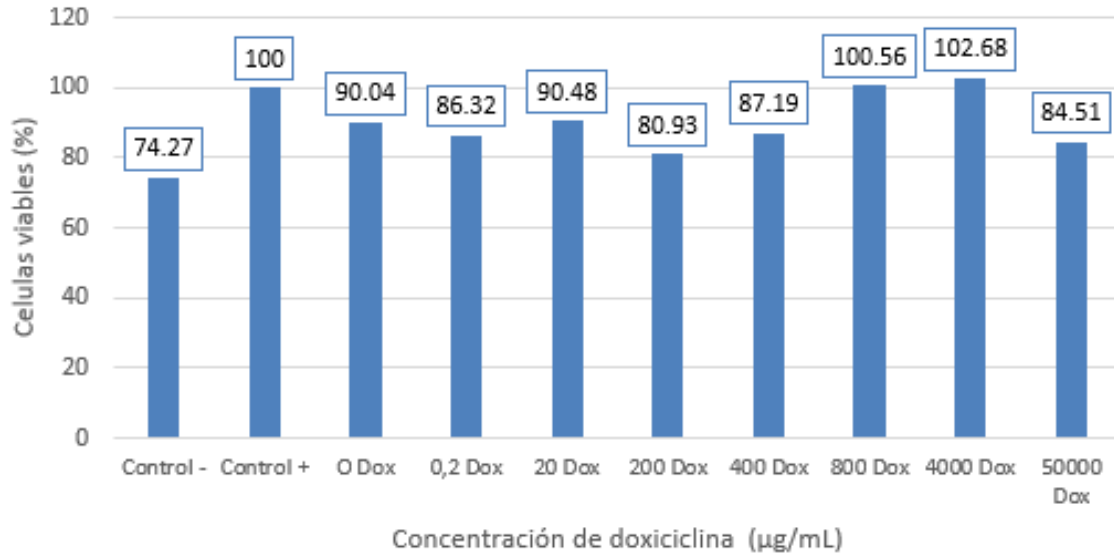


Figura 38. Viabilidad celular de fibroblastos gingivales humanos con los sustitutos óseos

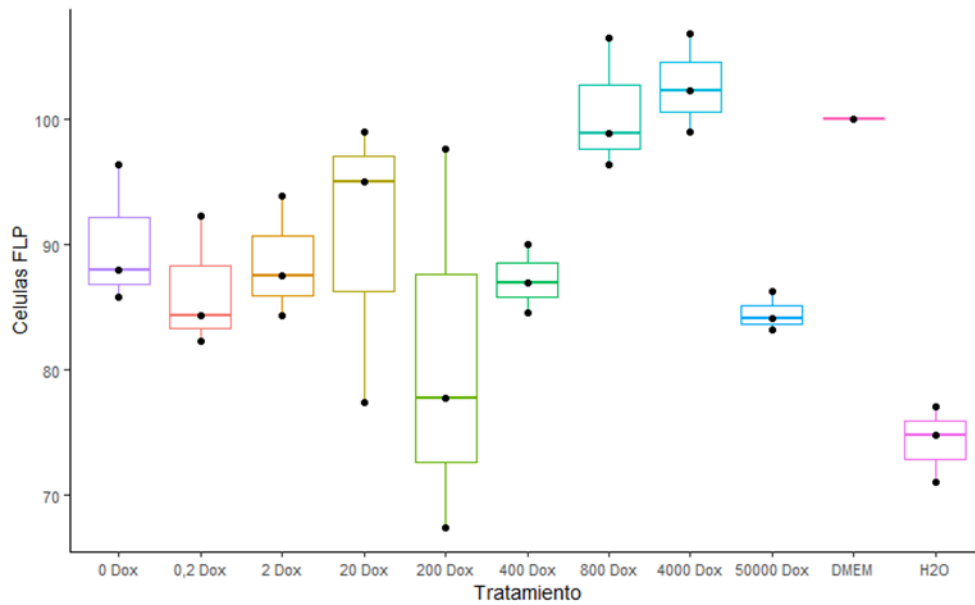


Figura 39. Diagrama de cajas y bigotes de la prueba de citotoxicidad del sustituto óseo según la concentración de doxiciclina

Los porcentajes de viabilidad celular son reportados como media  $\pm$  SEM de mínimo tres experimentos independientes. Se realiza ANOVA de una vía y se establecen las diferencias con respecto al control de células no tratadas con una significancia de  $p < 0,05$ . Las hipótesis para prueba con un factor son:

$$\begin{cases} H_0: \mu_{[0]} = \mu_{[1]} = \mu_{[2]} = \mu_{[3]} = \mu_{[4]} = \dots = \mu_{[11]} \\ H_1: \text{al menos un } \mu_i \neq \mu_j \text{ para todo } i \neq j \text{ con } i, j = 1, 2, \dots, 11 \end{cases}$$

Para la verificación de los supuestos de normalidad se empleó la prueba de Shapiro-Wilk (Tabla 27) para comprobar la normalidad de los datos, la cual arroja un valor p de 0,03977, siendo inferior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  de normalidad en los residuos, es decir, los residuos del modelo ANOVA para la prueba de toxicidad no siguen una distribución normal estándar.

Tabla 27. Prueba Shapiro Wilk para la prueba de citotoxicidad

Estadística de prueba	Valor P
0,9319	0,03977 *

Respecto al supuesto de homocedasticidad de la varianza de los errores del modelo ANOVA, se recurre a la prueba de Bartlett la cual indica un p-valor de  $3,695e^{-09}$ , siendo inferior a un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula de homocedasticidad en la varianza de los residuos, es decir, no se cumple el supuesto de homocedasticidad en el modelo (Tabla 28).

Tabla 28. Prueba de Bartlett para la homocedasticidad de la varianza en el ensayo de citotoxicidad

Prueba estadística	gl	Valor p
34,78	1	$3,695e^{-09}$ * * *

Al no cumplir los supuestos el modelo ANOVA, se recurre a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Tabla 29), que como ya se ha mencionado no depende de la distribución normal. La prueba de Kruskal-Wallis arroja un valor p de 0,01071 lo cual indica que se debe rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias por lo que la concentración de doxiciclina si posee un efecto significativo sobre el nivel de células.

Tabla 29. Prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis en la prueba de citotoxicidad

Prueba estadística	gl	Valor p
23,01	10	0,01071 *

Realizando una prueba de Tukey *a posteriori* cuando se rechaza la hipótesis nula en el ANOVA, se tiene que, de las 55 comparaciones posibles de los promedios por pares de los 11 compuestos diferentes dentro del diseño experimental, solo tres comparaciones resultan ser significativamente diferentes con valor  $p < 0,05$ . En el que se

puede destacar que las comparaciones de sustancias para los niveles de células FLP promedio de: compuesto 4000 Dox - compuesto 200 Dox, Compuesto en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Comp 4000Dox y como es de esperarse, la comparación control positivo-control negativo muestran diferencias significativas en el nivel de células FLP promedio viables luego de la prueba de citotoxicidad (Tabla 30).

Tabla 30. Comparaciones de supervivencia celular promedio a través de una prueba de Tukey

Comparación	Diferencia	Lim. Inferior	Lim. Superior	Valor p
Comp4Dox-Comp200Dox	21,76	1,84	41,68	0,0247
H2O-4Dox	-28,42	-48,34	-8,50	0,0016
NoTrat-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25,73	5,81	45,65	0,0050

El grado de toxicidad de los sustitutos probados en esta investigación, por la técnica de elución de extractos, según el RGR (tasa de crecimiento relativo de células), se encuentra entre 0 y 1 ya que se obtuvo una supervivencia entre 75-99% y del 100% en algunos casos, respectivamente [162]. Siguiendo las recomendaciones de la norma ISO 10993-5:2009 [163] también se cumplen los estándares de citotoxicidad para dispositivos médicos, los cuales consideran como citotóxico un producto o dispositivo que arroje para esta prueba niveles de viabilidad celular inferiores a 30 %.

Algunos autores mostraron viabilidades que coinciden con los resultados obtenidos para todos los sustitutos óseos, reportando valores alrededor de 90 % [164] y 100 % [165] en sustitutos óseos inyectables similares. Lo que implica que el sustituto óseo propuesto puede considerarse adecuado para su implantación en tejidos vivos.

### 5.2.7 Actividad antimetaloproteinasas

Los geles de poliacrilamida al 8 % obtenidos se colocaron en sobres plásticos protectores y se retiraron cuidadosamente las burbujas por presión con paletas plásticas de Biorad® y luego se escanearon a diferentes tiempos de tinción y lavado para lograr la mejor imagen, descartando y repitiendo los que no mostraran claridad de acción colagenolítica y anticolagenolítica. Se obtuvieron más de 20 geles entre ensayos previos, réplicas y repeticiones del protocolo final y se seleccionaron dos geles característicos para mostrar un resumen gráfico de los hallazgos cualitativos más relevantes (Figuras 40 y 41).

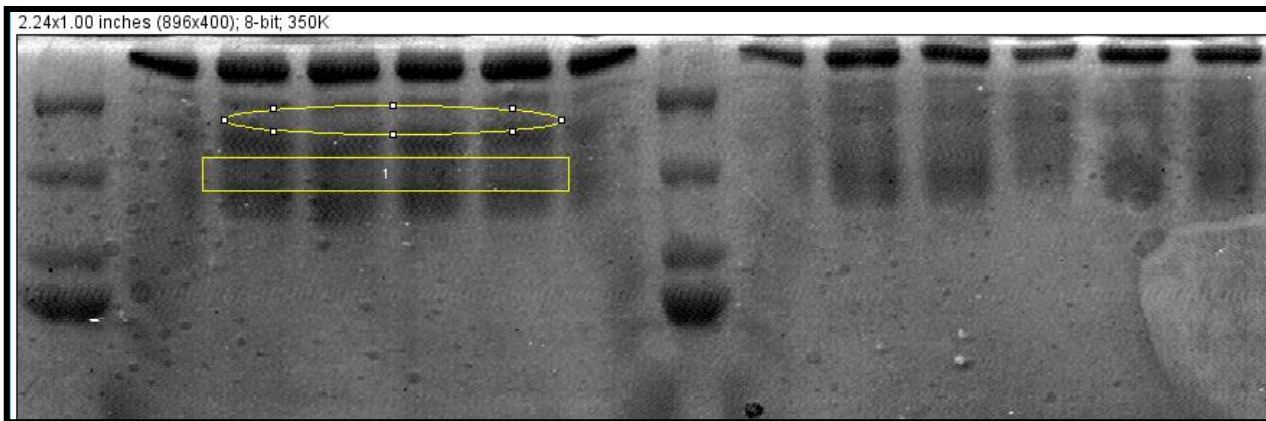
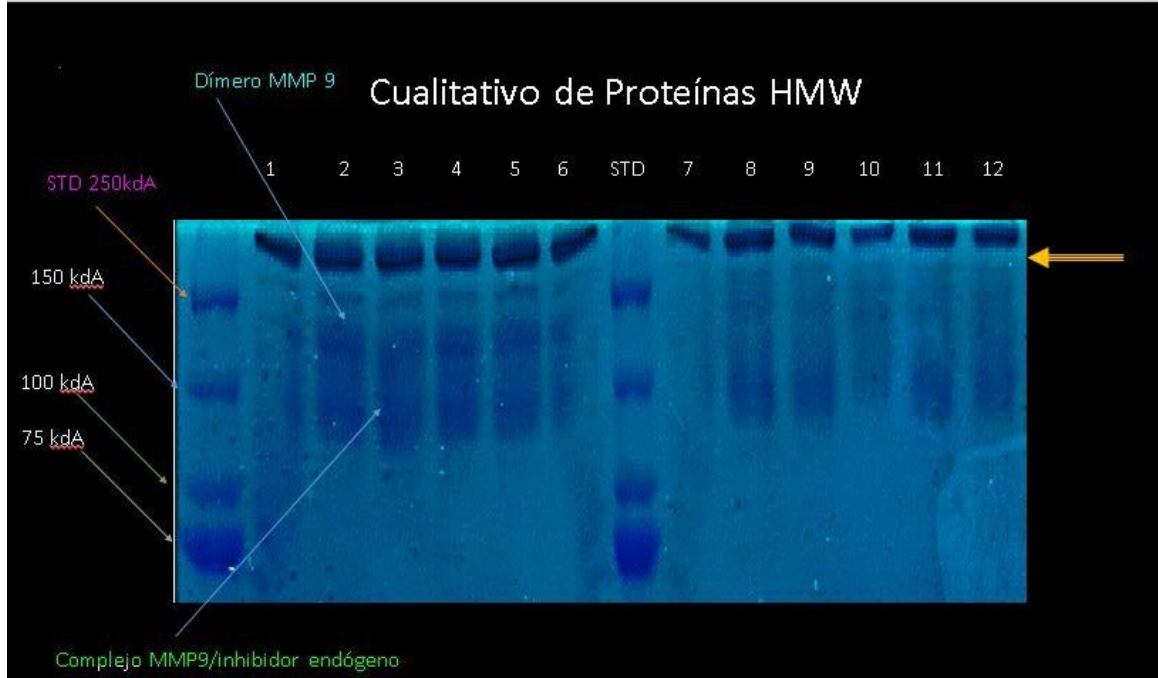


Figura 40. Evaluación cualitativa de proteínas de alto peso molecular

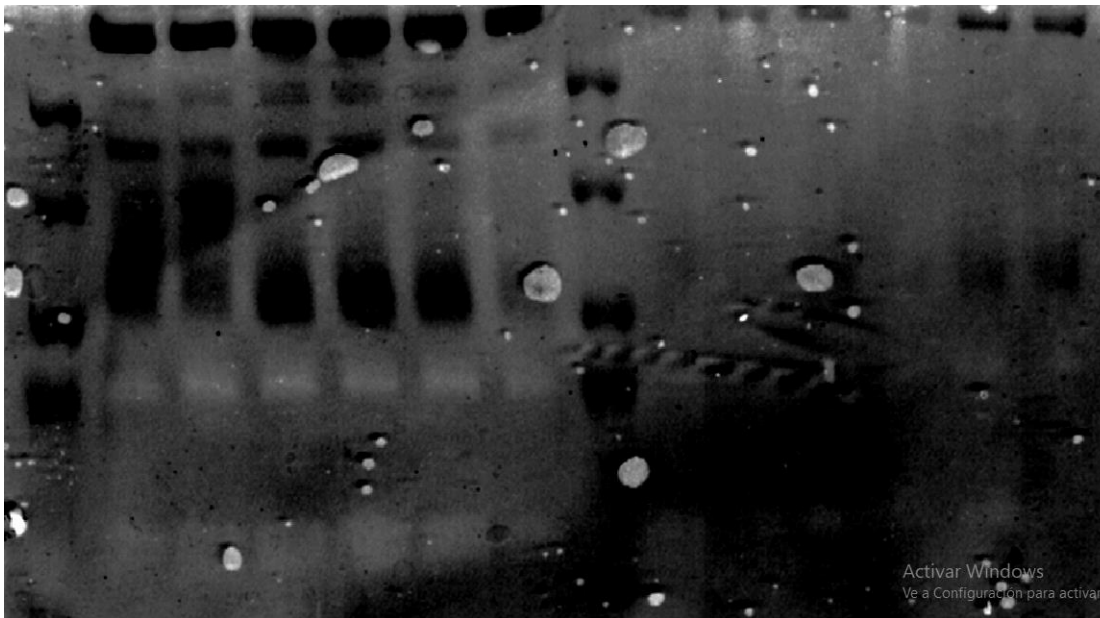
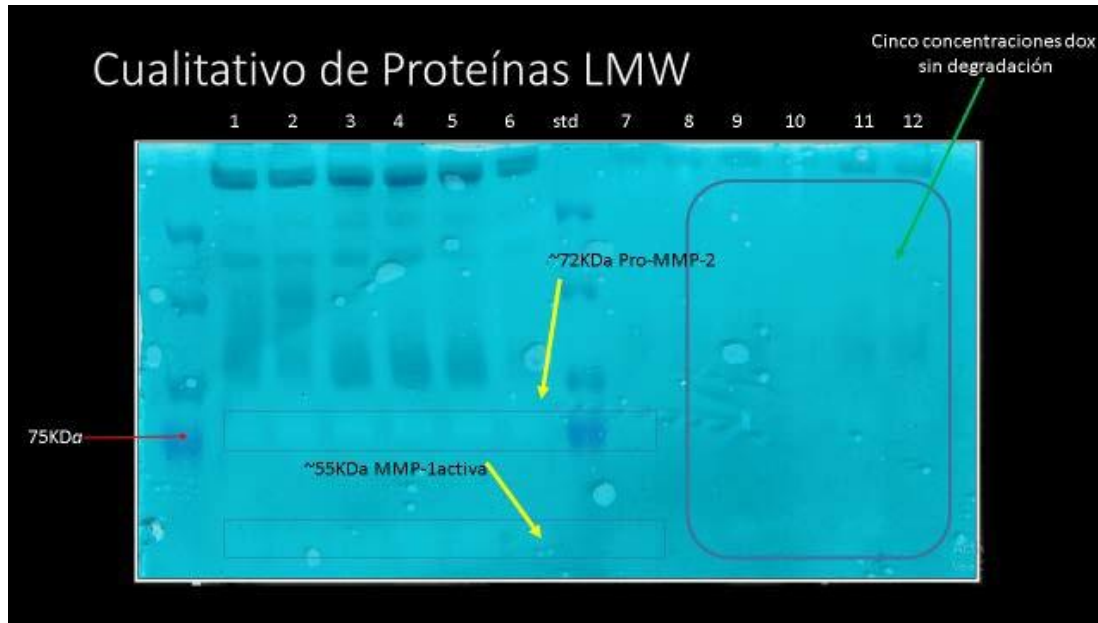


Figura 41. Valoración cualitativa de proteínas de bajo peso molecular

Los geles lavados se colocaron en protectores plásticos y se les retiró toda el agua sobrante para evitar interferencias. Sin embargo, el metanol residual en los geles se evapora con el calor del escáner y puede ocasionar la aparición de pequeñas burbujas como se ven en las figuras 41 y 42. Estas burbujas no afectaron la lectura de las imágenes.

Posteriormente, las imágenes obtenidas de los geles en un escáner convencional fueron procesados y analizados con los programas Image J y un Scan it para cuantificación de amplitud de bandas (intensidad de degradación).

La diferencia en tonalidad de las bandas se explica en que la cantidad de material del pozo tanto en los materiales probados como en el estándar de peso, va disminuyendo en la medida en que caen por el gel y se van quedando atrapadas las moléculas de mayor de peso molecular, de manera que las bandas de las proteínas de más alto peso se observan más oscuras y va decreciendo desde la zona de finalización del gel concentrador hasta el final de la corrida del gel. Para las MMPS 2 y 9 se ha usado el gel de 8 % acrilamida-poliacrilamida por que ha demostrado un tamaño de poro adecuado, sin embargo, puede modificarse la concentración del gel aumentando o disminuyendo la cantidad de polímero para lograr geles con poros de menor o mayor tamaño, respectivamente [166].

Los carriles 1, 6, 7 corresponden a plasma solo, 400 Dox, Dox sola y sustituto óseo sin Dox respectivamente. Estos tres carriles se comportan igual, mostrando una lisis amplia de la gelatina. Como se esperaba, la gelatina en el carril 1 se degrada completamente por la mayor concentración y gran cantidad de diversas proteasas activas y latentes presentes en el plasma solo. Los carriles 2 a 6 que tenían en su pozo las concentraciones subantimicrobianas de 0,2 a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxiciclina y plasma, mostraron sorprendentemente una degradación proteolítica, siendo significativamente mayor en el carril 6 donde la concentración 400 Dox de doxiciclina se comporta como el carril 1 con plasma solo. Así mismo, el carril 7 que tiene en el pozo con sustituto y sin tetraciclina mostró gran degradación proteolítica, muy similar a los carriles 1 y 6. Es posible que el pequeño tamaño y carga de la molécula de Dox haga que pase rápidamente por el gel sin lograr la acción anti proteolítica esperada. La inhibición que la Dox ejerce sobre las MMPs se da por medio de una unión no covalente y por lo tanto pudo haber sido revertida por la acción de los campos eléctricos (Opinión experto). Los análisis de resultados se presentan en las Figuras 42 a 47. La Figura 42 muestra la medición semicuantitativa de la intensidad de banda de proteólisis ocurrida a concentraciones de 02Dox, 2 Dox, 20 Dox y 200 Dox.

Es un efecto común en estos tipos de geles que se produzca una especie de “arrastre” en los carriles que quedan en los extremos (no reportado en la literatura, corresponde a opinión de experto; Dr. Patricio Silva, Bioquímico Universidad de Chile). Por lo tanto, aunque en los geles visualmente puede detectarse bandas de proteólisis, ellas quedan distorsionadas y el programa de cuantificación no la identifica como banda continua, por eso las Figuras 44 y 45 no presentan picos en los carriles extremos correspondientes a sustituto sin Dox y al sustituto 400 Dox

Las figuras 42 a 49 muestran una valoración subjetiva de la intensidad de la degradación proteolítica de los geles. No se pueden considerar unidades de medida absoluta, se utiliza para hacer comparaciones cualitativas y semicomparativas entre grupos.

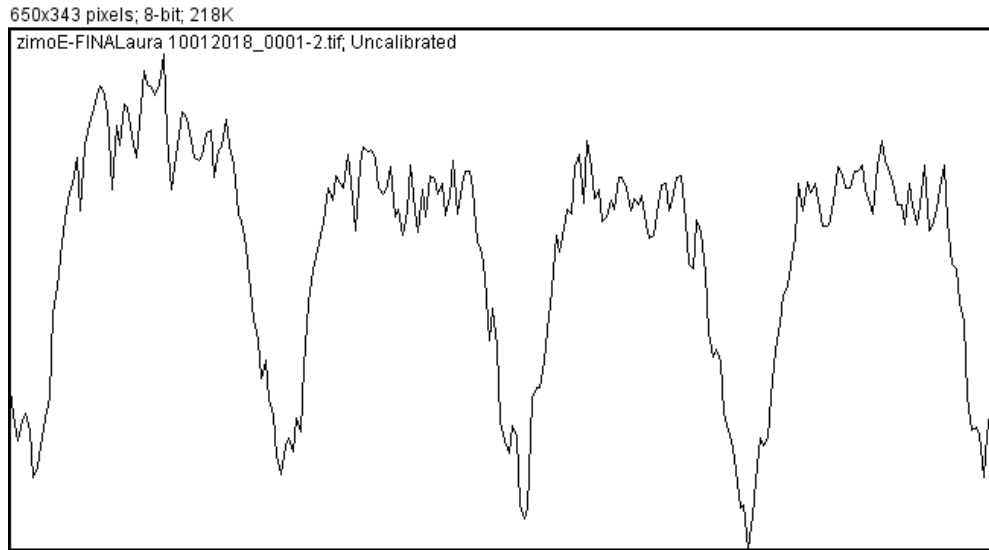


Figura 42. Análisis de bandas de bajo peso molecular de concentraciones 0,2 Dox, 2 Dox, 20 Dox y 200 Dox

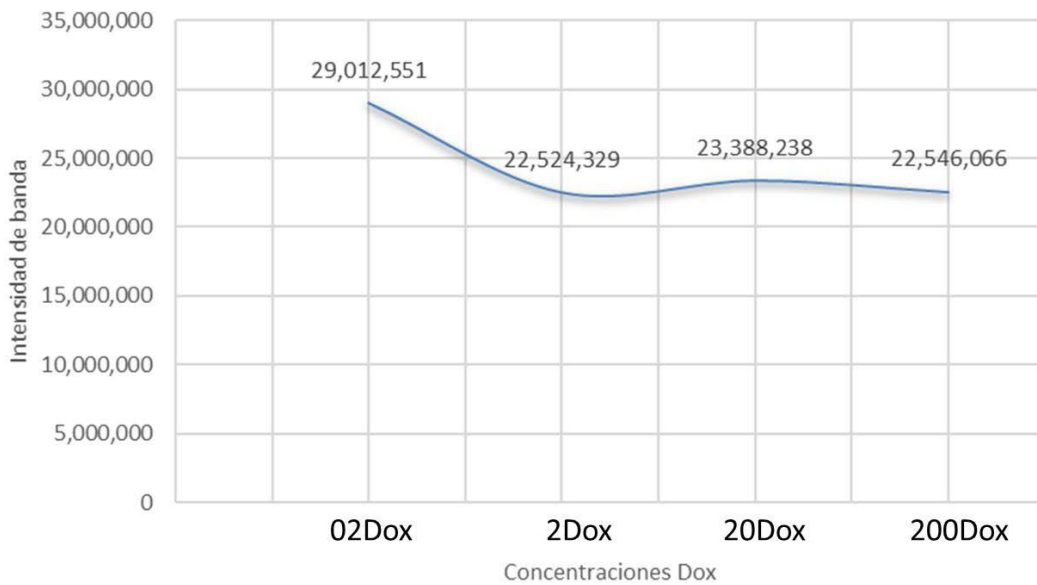


Figura 43. Valoración cuantitativa de HMW. Dímero MMP-9. 0,2 Dox, 2 Dox, 20 Dox y 200 Dox



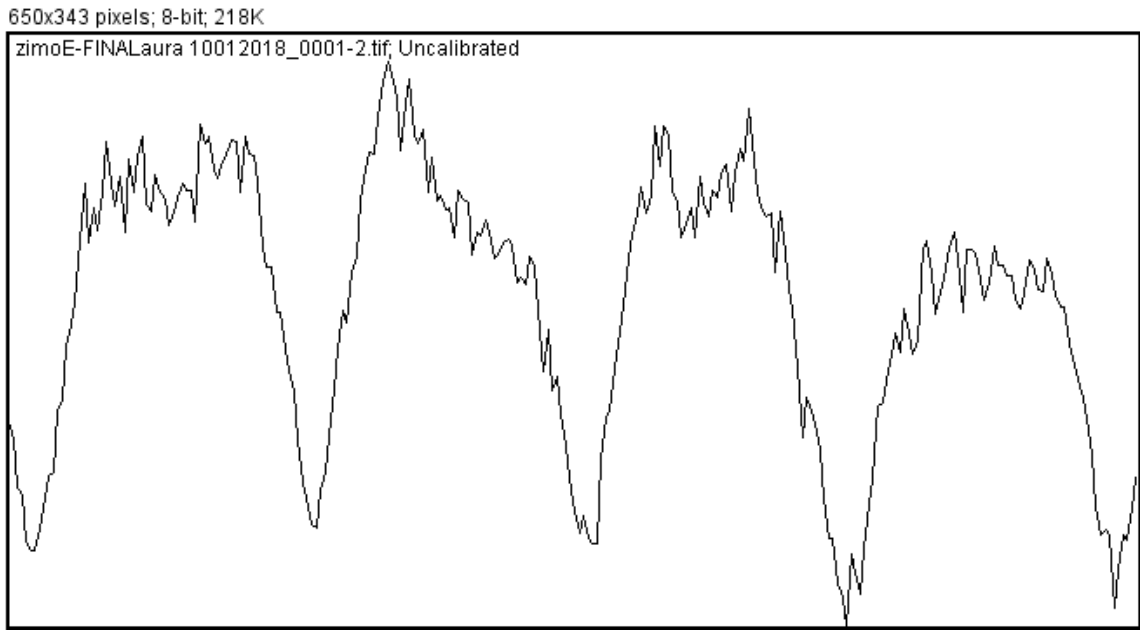


Figura 44. Análisis de bandas de degradación proteolítica en posición dímero MMP-9, concentraciones de doxiciclina 02 Dox, 2 Dox, 20 Dox y 200 Dox

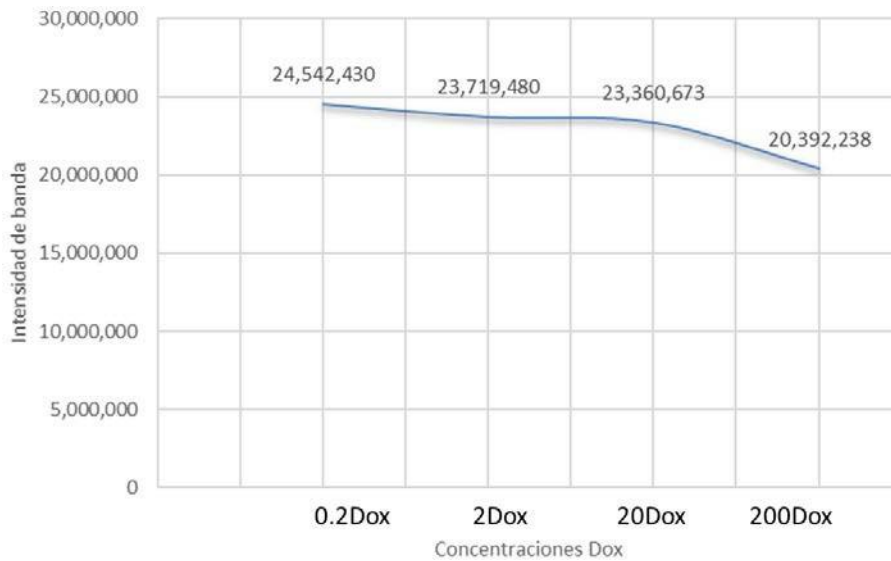


Figura 45. Valoración cuantitativa de HMW. Complejo MMP9-TIMP

Respecto al complejo MMP9 – TIMP (Tabla 31) se encontró que las bandas tienen un ancho promedio global de 23003705 unidades de medición (UM) y el ancho de banda promedio con un nivel de confianza cercano al 95 % se encuentra en el intervalo [19324457 UM; 26686953 UM], además se puede apreciar una tendencia decreciente

en el ancho de banda a medida que se pasa de la concentración de doxiciclina 1 a la 4 lo que puede sin embargo estar influenciado por otros factores diferentes a la concentración de Dox. Los valores estadísticos representativos de MMP1 y MMP2 se adjuntan en la Tabla 32.

Tabla 31. Resumen de estadísticos para MMP9

Estadísticos	Complejo MMP9-TIMP	Dímero MMP-9
<b>Media</b>	23.003.705,25	24.367.796,00
<b>Error típico</b>	904.949,10	1.561.258,94
<b>Mediana</b>	23.540.076,50	22.967.152,00
<b>Moda</b>	#N/A	#N/A
<b>Desviación estándar</b>	1.809.898,20	3.122.517,88
<b>Rango</b>	4.150.192,00	6.488.222,00
<b>Mínimo</b>	20.392.238,00	22.524.329,00
<b>Máximo</b>	24.542.430,00	29.012.551,00
<b>Cuenta</b>	4,00	4,00

Tabla 32. Estadísticos MMP1 y MMP2

Estadísticos	MMP2-Gelatinasa B latente 72KDa	MMP-1 latente Banda 55 KDa
<b>Media</b>	2.530.516,75	3.866.365,50
<b>Error típico</b>	380.661,83	828.359,39
<b>Mediana</b>	2.824.277,50	4.441.823,50
<b>Moda</b>	#N/A	#N/A
<b>Desviación estándar</b>	1.076.674,24	2.342.954,18
<b>Rango</b>	3.295.196,00	6.399.196,00
<b>Mínimo</b>	280.385,00	76.607,00
<b>Máximo</b>	3.575.581,00	6.475.803,00
<b>Cuenta</b>	8,00	8,00

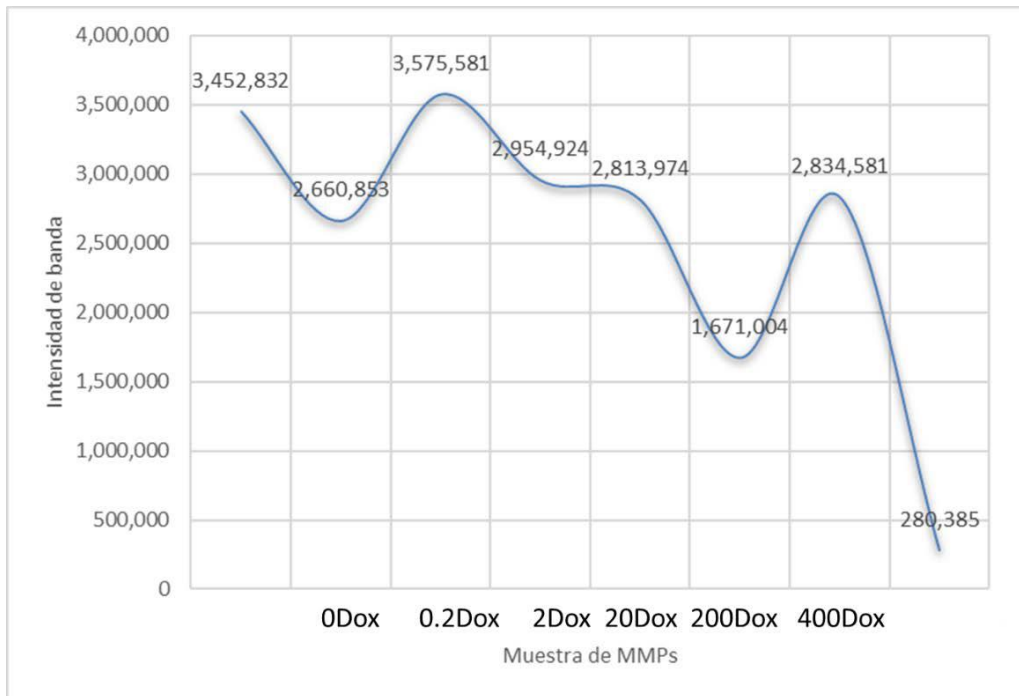


Figura 46. Cuantitativo MMP2-Gelatinasa B latente 72KDa

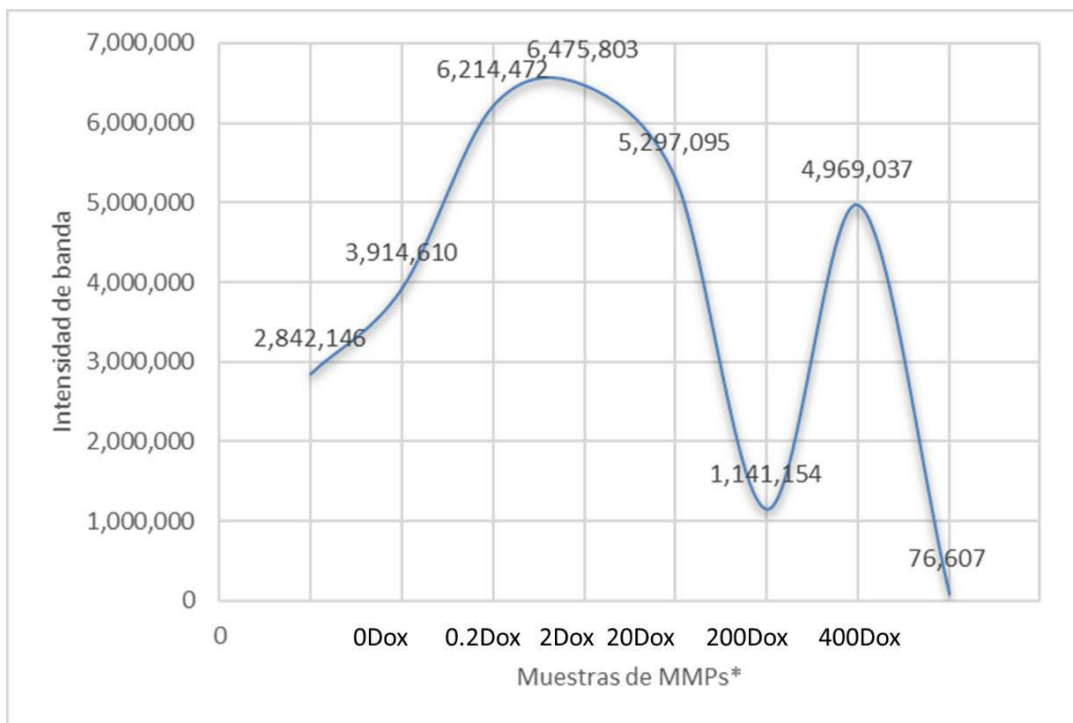


Figura 47. Análisis cuantitativo de MMPs de bajo peso molecular (LMW) MMP-1 latente 55KDa\*\*: Este valor ya corresponde a la primera muestra de sustituto con Dox

En el dímero MMP-9 se encontró que las bandas tienen un ancho promedio global de 24367796 UM, y el ancho de banda promedio con un nivel de confianza cercano al 95 % se encuentra en el intervalo [17103343 UM; 31632249 UM], y al igual que el caso anterior se puede apreciar una tendencia decreciente, aunque más estable, en el ancho de la banda a medida que se pasa de la concentración de doxiciclina 1 a la 4 (Figura 48).

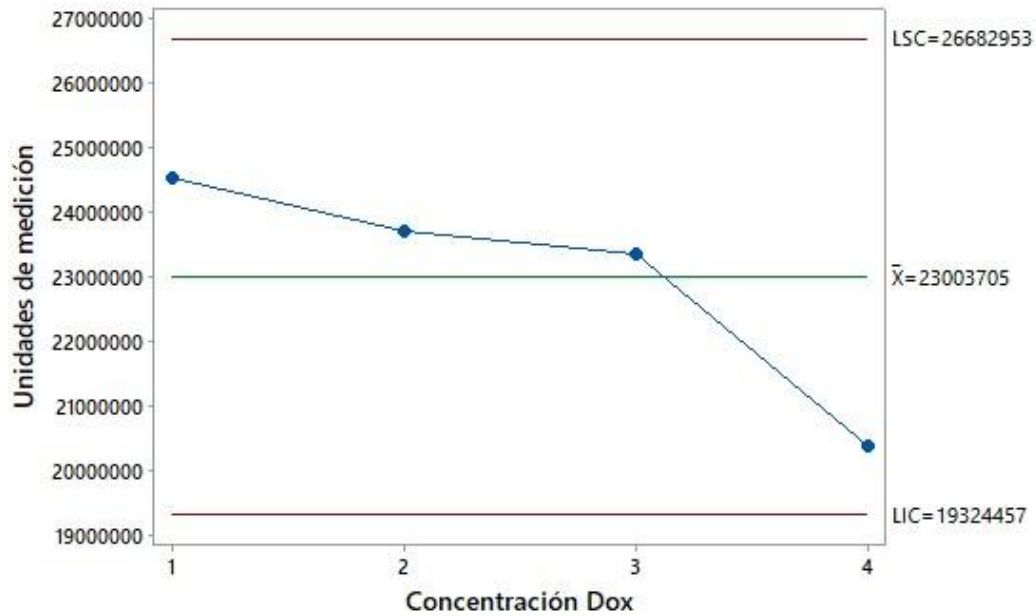


Figura 48. Carta de control MMP9-TIMP

También debe considerarse una posible inhibición de la doxiciclina en el pozo que contenía sólo plasma y Dox, a raíz de la tendencia de la doxiciclina a formar complejos con metales, entre ellos el hierro de la sangre. Si bien el sustrato utilizado fue el plasma (sin plaquetas ricas en hierro), los gránulos de las plaquetas se liberan con facilidad aportando más hierro al medio, sin contar con el Fe que estaba presente libre en la sangre al tomar la muestra. Considerando que se utilizaron MMPs naturales libres en la sangre de un paciente sano y no gelatinasas puras, se debe prever que otras moléculas que no están bajo estudio interactúan inevitablemente con la muestra.

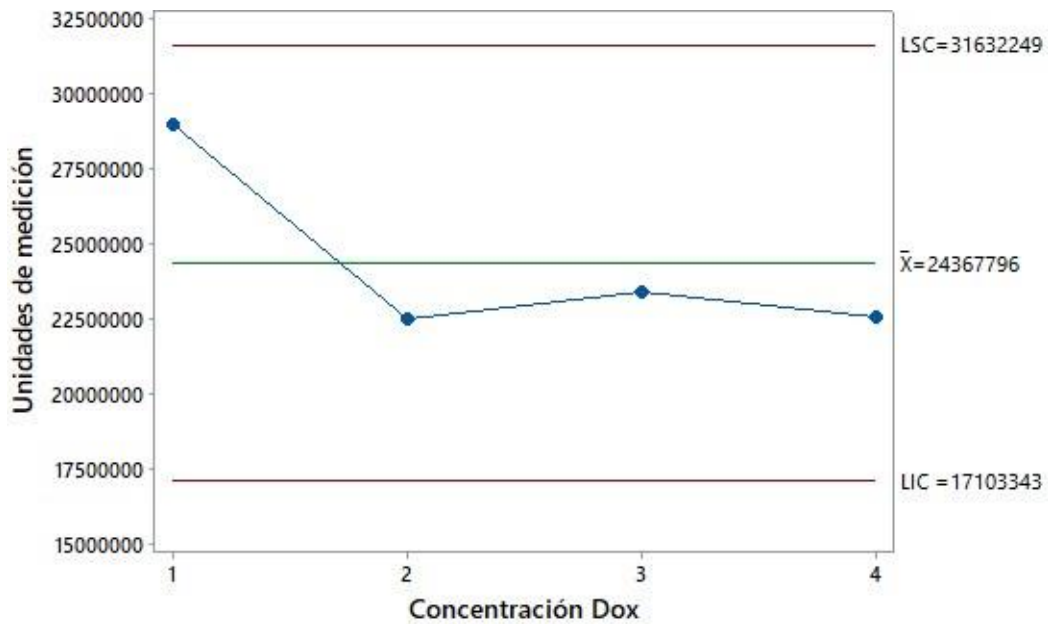


Figura 49. Dímero MMP-9

Para hacer más específico el experimento pueden utilizarse gelatinasas puras, pero se vuelve más costoso o puede también someterse el plasma a separación de sus componentes proteicos previamente.

Por otro lado, el carragenano puede favorecer la sustentividad del sustituto óseo sobre las metaloproteinasas de dos maneras:

1. Muestra una afinidad especial por los iones Fe (posible mecanismo de su efecto anticoagulante) puede estar interactuando con dichos metales mejorando o manteniendo el efecto esperado dentro de la pleitropía de la doxiciclina hiclato.
2. Los polímeros altamente sulfatados como el carragenano se unen a los iones calcio por interacción anión-cación [167].

Todos los sustitutos con doxiciclina mostraron excelente actividad antiproteolítica sin importar la concentración de doxiciclina. Esto se explica con el efecto de la doxiciclina ya conocido sobre las proteinasas y a que además se potencia su efecto cuando se une a cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  [168] y al hierro en la sangre [169].

Posiblemente también la presencia del sustituto ayudó a mantener un pH mayor a 7,1 donde la doxiciclina es más activa comparado con los pozos de la doxiciclina sola, la cual puede tener valores de pH de 1,5. Además, *in vivo*, es decir en la sangre, las tetraciclinas son transportadas como complejos con el calcio y dentro de la célula, la

formación de complejos con el ión magnesio es el principal mecanismo para este transporte. Se deduce por lo que tanto, que el material inyectable evaluado, al ser rico en Ca favorece el transporte del medicamento como lo indica la literatura [60] y sugieren los hallazgos de electroforesis en gel de este estudio.

Otro aporte del sustituto al buen desempeño antimetaloproteinasas de la doxiciclina en este estudio, puede deberse a que le dio sustentividad al medicamento de manera que tuviera mayor contacto con las MMPs y con ello mayor acción inmunomoduladora.

### *Observaciones generales*

Basándose en los procedimientos seguidos para la fabricación y análisis del sustituto óseo se tienen algunas apreciaciones sobre el proceso de almacenamiento, que se mencionarán a continuación y que facilitan el trabajo con este tipo de materiales.

- El material inyectable se conserva mejor en refrigeración a 4 °C por que se disminuye la evaporación de agua y evita la pérdida de actividad que se puede producir en la tetraciclina por acción de la luz (fotosensible).
- Luego de aproximadamente una semana fuera de refrigeración, el sustituto sufre deterioro principalmente por hongos, lo cual está asociado a su vehículo acuoso y al contenido de polímero higroscópico, además se endurece impidiendo la inyección del material.
- Radiopacidad: la radiopacidad es una característica imprescindible en los materiales implantados de manera que pueda controlarse su lugar de aplicación inicial ideal y reportar si se produce algún desplazamiento patológico. En caso de materiales reabsorbibles, la radiopacidad es útil para monitorear el recambio óseo del material que ha sido introducido. Se realizaron radiografías del polvo de HA solo, carragenano solo, sulfato de Ba solo y compuesto HAp-CRG-Dox con y sin material de contraste tipo sulfato de Ba. Las imágenes de la Figura 50 tomadas a las radiografías muestran como la HAp sola y el compuesto HAp-CRG-Dox sin Ba muestran radiopacidad difusa similar a la del hueso, sin embargo, la adición de 0,5 g de Ba en cada muestra de 3 mm de espesor, demostró una radiopacidad metálica similar a la producida por materiales como amalgamas o núcleos metálicos que facilitan la identificación del material inyectable en contraste con el hueso circundante. Se debe, sin embargo, evaluar la influencia de la adición de Ba en las propiedades físico-químicas y mecánicas del material compuesto.



(A)



(B)

Figura 50. Radiopacidad comparativa de (A) 10 mg HAp sola (inferior derecha), sustituto óseo sin Ba (inferior izquierda), 10 mg de Ba solo (superior derecha) y sustituto HAp -CRG -Dox + 0,5 g Ba (B) Sustituto óseo con 0,5 g de Ba en espesor mínimo de jeringa (derecha) y espesor central 3mm (izquierda)

## 6. Conclusiones

- Se obtuvo un material cerámico tipo hidroxiapatita sintética con características nanométricas, en forma de nanobarras usando el método hidrotermal, que posteriormente sirvió como componente estructural del sustituto óseo inyectable fabricado.
- Fue posible establecer un protocolo para la fabricación de sustituto óseo inyectable compuesto de hidroxiapatita-carragenano-doxiciclina (HAp-CRG-Dox) para su potencial uso en ingeniería de tejidos del complejo maxilofacial, con proporciones de 60 % de hidroxiapatita y 1,5 % de carragenano, además de diferentes cantidades de doxiciclina hclato.
- La evaluación de las propiedades de biodegradabilidad de los sustitutos óseos, mostró un material estable en el tiempo, con capacidad de formar una película de apatita sobre su superficie, mostrando su bioactividad.
- El material compuesto HAp-CRG-Dox presenta propiedades mecánicas aceptables para ser usado en defectos óseos contenidos. No debe usarse para zonas que soporten carga axial fuerte ya que la resistencia compresiva obtenida es equivalente a hueso predominantemente medular.
- Todos los sustitutos óseos fabricados presentan una fuerza máxima promedio de extrusión del material que se estableció en 60 N, la cual puede ser realizada manualmente; además mostraron porcentajes de inyectabilidad por encima del 90 %.
- Los fibroblastos gingivalis humanos mostraron un porcentaje de supervivencia celular alta (mayor al 70 %), luego de estar en contacto con los sustitutos óseos evaluados independientemente de la adición de doxiciclina hclato.



- Se logró verificar el efecto de la adición de tetraciclina, específicamente del tipo doxiciclina, en las propiedades antimicrobianas. Se mostró cómo para concentraciones subantimicrobianas 0,2 Dox, 2Dox, 20 Dox, 200 Dox y 400 Dox, no se logra inhibir el crecimiento de la *Escherichia coli* y la *Porphyromonas gingivalis*; caso contrario sucede con dosis de 4000 Dox, 50000 Dox y 800 Dox que demuestran ser antimicrobianas en esta prueba *in vitro* debido a que tienen la concentración suficiente para inhibir la subunidad ribosomal 30s de las cepas evaluadas.
- Las concentraciones de doxiciclina reportadas como subantimicrobianas y usadas en la fabricación de los sustitutos óseos HAp-CRG-Dox, son en efecto silenciadoras de la acción de las metaloproteasas de origen en células de mamíferos.
- Un sustituto óseo inyectable de hidroxiapatita/carragenano y concentraciones entre 0,2 µg/mL y 200 µg/mL es óptimo para producir una acción antimetaloproteinasas mamarias, acción antiproteinasa bacterianas, efecto antiinflamatorio, coadyuvante en estados artríticos, sin afectar las propiedades fisicoquímicas de sus componentes individuales y sin riesgo de producir resistencia bacteriana ni efectos sistémicos colaterales indeseables, debido a las bajas concentraciones utilizadas y en la aplicación localizada del fármaco.
- Según los resultados obtenidos este biomaterial es un sustituto óseo con potencial aplicación en regeneración ósea del complejo maxilo facial, especialmente en pacientes con enfermedades o condiciones sistémicas que afecten la cicatrización y la homeostasis de los tejidos óseos.
- Este sustituto estaría bien indicado en casos de implantes post-extracción inmediatos en pacientes con antecedentes periodontales, especialmente aquellos con periodontitis agresivas o de difícil manejo.

## 7. Recomendaciones y propuestas

Considerando los buenos resultados del material propuesto y desarrollado, se proponen algunas mejoras en la fabricación y escalamiento del material.

- Elaboración del material compuesto con agua USP o Invitrogen para garantizar pH neutro (Figura 51).



Figura 51. Agua nanopura libre de DNAsa y RNAsa de Invitrogen® Tomada de Fisher Scientific [www.fishersci.es/shop/products/ultrapure-dnase-rnase-free-distilled-water-2/p-7076316](http://www.fishersci.es/shop/products/ultrapure-dnase-rnase-free-distilled-water-2/p-7076316).

Esta agua destilada cumple con los estándares de agua ultrapura USP y promete además ser libre de DNAsa y RNAsa y, más importante aún para este tipo de material, ofrece un pH garantizado de 7,0 dada la importancia que encontramos sobre el control del pH tanto para la compatibilidad celular como para el desempeño de la doxiclina hiclato.

- Elaboración del material en cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.
- Debe evaluarse el uso de glutaraldehído como entrecruzante y usar en su reemplazo entrecruzantes naturales que no induzcan respuesta adversa en el huésped.
- Con las pruebas piloto para el ensayo de electroforesis, se encontró que entre usar suero y plasma como fuente natural de MMPs, el plasma se comportó mejor y al usar tubos con EDTA, heparina y citrato, los dos últimos producen buenos resultados. Sin embargo, luego de analizar las variaciones que pueden pasar en el experimento, se sugiere explorar las diferencias entre plasma rico en plaquetas y plasma

pobre en plaquetas lo cual se hace tomando la parte más superficial del sobrenadante, con la hipótesis de que éste puede estar más libre de sesgo provisto por la degranulación que ocurre en las plaquetas con la centrifugación.

- En la utilización de sangre y derivados como fuente natural de MMPs debe considerarse que el uso de pacientes sanos (como se hizo en este caso), tiene menos concentraciones circulantes de MMPs con respecto a un paciente con patologías como diabetes, osteoartritis, periodontitis, especialmente la MMPs, En este orden de ideas, puede considerarse como una mejor opción para este experimento, tomar la sangre de pacientes con estas patologías.
- Evaluar la posibilidad de disponer los componentes por separado para alargar la vida útil. (Cuando los materiales se dispensan de forma separada se controla el momento de inicio de la reacción, tiempo final de fraguado y evaporación de componentes líquidos.)
- Evaluar la posibilidad de aumentar la concentración de carragenano para dar mayor soporte al material cerámico (biomimesis con el hueso natural).
- Para aumentar la sensibilidad del ensayo en SDS-PAGE se recomienda usar gelatinasas comercialmente puras.
- Para mejorar los resultados de imágenes de los geles obtenidos en el ensayo electroforesis se sugiere aumentar las veces que se lava el gel con agua destilada antes de escanearlos, sin dejarlos mucho tiempo en el agua destilada para evitar que se pierda la coloración como se comprobó al evaluar diferentes protocolos de tinción-lavado.
- Incorporar diferentes sustancias radiopacas en diferentes concentraciones y evaluar si afectan las propiedades encontradas en esta investigación y en qué cantidad deben incorporarse al compuesto.
- Puede a futuro, incorporarse la recomendación de la ASTM1027-86 reprobada en 2017, en cuanto a que la diálisis de la sangre sirve para remover toxinas, medicamentos ingeridos y otros inhibidores por debajo de 3.500 Da y podría optimizar el uso de metaloproteinasas endógenas.

Anexo A. Ficha técnica de Carragenano



caisson.

I A B S

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Product Name: **Carrageenan**

Catalog Number: Lot Number: CAS Number:

C034 04182004

9000-07-1

Source: Red Seaweed Storage: 15 to 30°C

Retest Date: 31-DEC-2019

<b>Test</b>	<b>Specifications</b>	<b>Results</b>
Appearance Identity Test	Light Beige	PASS
Gel Strength	Powder Passes Test Record	302 gm/cm <sup>2</sup> PASS
pH	Record	8.74
Particle Size (U.S.S. 60 mesh)	98%	PASS
Loss on Drying	Record	8.5 %

Total Aerobic Plate Count	< 2000 cfu/g	200 cfu/g
Molds & Yeast	< 200 cfu/g	< 20 cfu/g
E. coli	Negative	PASS
Salmonella	Negative	PASS
Plant Cell Culture	Passes Test	PASS

**This product meets or exceeds the quality standards established by Caisson Laboratories, Inc.**

*This product is intended for Laboratory Use Only*

Prepared by: Reviewed by.:



BK

Aaron Dryden Quality Control

04/09/2018

836 South 100 East  
Smithfield, Utah 84335

Phone: 435 755 7615  
Fax: 435 755 7617

Toll Free: 877 840 0500 [www.caissonlabs.com](http://www.caissonlabs.com)

## Anexo B. Ficha técnica de Doxiciclina hclato

According to Regulation [EC] No. 1907/2006  
Version 1.2  
Revised 24/11/201



# MATERIAL SAFETY DATA SHEET

### 1. IDENTIFICATION OF THE SUBSTANCE/MIXTURE AND OF THE COMPANY/UNDERTAKING

#### Product identifiers

Product name: Doxycycline hyclate powder  
Product number: P06-01310P  
Brand: PAN Biotech

#### Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Identified uses: Laboratory chemicals, Manufacture of substances

#### Details of the supplier of the safety data sheet

Company PAN Biotech GmbH  
Am Gewerbepark 13  
94501 Aidenbach  
GERMANY

---

## 2. HAZARDS IDENTIFICATION

### Classification of the substance or mixture

Not a hazardous substance or mixture according to Regulation (EC) No. 1272/2008.

This substance is not classified as dangerous according to Directive 67/548/EEC.

### Label elements

Labelling according Regulation (EC) No 1272/2008 [CLP]



Pictogram

Signal word

Warning

Hazard statement(s)

H302

Harmful if swallowed

H315

Causes skin irritation

H319

Causes serious eye irritation

P06-01310P

H335	May cause respiratory irritation.
Precautionary statement(s)	
P261	Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P305 + P351 + P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
Supplemental Hazard Statements	none

### 3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

Formula :  $C_{22}H_{25}ClN_2O_8 \cdot \frac{1}{2}H_2O \cdot \frac{1}{2}C_2H_6O$

Molecular Weight : 512,94 g/mol

CAS-No.: 24390-14-5

No components need to be disclosed according to the applicable regulations.

### 4. FIRST AID MEASURES

#### **If inhaled**

If breathed in, move person into fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Consult a physician.

#### **In case of skin contact**

Wash off with soap and plenty of water. Consult a Physician

#### **In case of eye contact**

Rinse thoroughly for at least 15 minutes with plenty of water and consult a physician.

#### **If swallowed**

Never give anything by mouth to an unconscious person. Rinse mouth with water. Consult a physician.

#### **Most important symptoms and effects, both acute and delayed**

To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated.

#### **Indication of any immediate medical attention and special treatment needed**

### 5. FIREFIGHTING MEASURES

#### **Extinguishing media**

#### **Suitable extinguishing media**

Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.

#### **Special hazards arising from the substance or mixture**

Nature of decomposition products not known.

#### **Advice for firefighters**

Wear self contained breathing apparatus for firefighting if necessary.

### 6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

#### **Personal precautions, protective equipment and emergency procedures**

Avoid breathing vapours, mist or gas.

#### **Environmental precautions**

No special environmental precautions required



---

**Methods and materials for containment and cleaning up**

Keep in suitable, closed containers for disposal.

**7. HANDLING AND STORAGE****Precautions for safe handling**

Normal measures for preventive fire protection.

**Conditions for safe storage, including any incompatibilities**

Store in cool place. Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place. Containers which are opened must be carefully resealed and kept upright to prevent leakage.

**Recommended storage temperature:** +2 - +8 °C

**8. EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION****Control parameters****Components with workplace control parameters****Exposure controls****Appropriate engineering controls**

General industrial hygiene and safety practice.

**Personal protective equipment****Eye/face protection**

Use safety glasses with side-shields conforming to EN 166. Use equipment for eye protection tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or EN 166(EU).

**Skin protection**

Handle with gloves. Gloves must be inspected prior to use. Use proper glove removal technique (without touching glove's outer surface) to avoid skin contact with this product. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices. Wash and dry hands. The selected protective gloves have to satisfy the specifications of EU Directive 89/686/EEC and the standard EN 374 derived from it.

**Body Protection**

Complete suit protecting against chemicals. The type of protective equipment must be selected according to the concentration and amount of the dangerous substance at the specific workplace.

**Respiratory protection**

For nuisance exposures use type P95 (US) or type P1 (EU EN 143) particle respirator. For higher level protection use OV/AG/P99 (US) or type ABEK-P2 (EU EN 143) respirator cartridges. Use respirators and components tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or CEN (EU).

---

**Skin protection**

Handle with gloves. Gloves must be inspected prior to use. Use proper glove removal technique (without touching glove's outer surface) to avoid skin contact with this product. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices. Wash and dry hands. The selected protective gloves have to satisfy the specifications of EU Directive 89/686/EEC and the standard EN 374 derived from it.

**Body Protection**

Complete suit protecting against chemicals. The type of protective equipment must be selected according to the concentration and amount of the dangerous substance at the specific workplace.

**Respiratory protection**

For nuisance exposures use type P95 (US) or type P1 (EU EN 143) particle respirator. For higher level protection use OV/AG/P99 (US) or type ABEK-P2 (EU EN 143) respirator cartridges. Use respirators and components tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or CEN (EU).

## 9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

<b>Appearance Form:</b>	Form: powder
<b>Odour</b>	no data available
<b>Odour Threshold</b>	no data available
<b>pH</b>	no data available
<b>Melting point/freezing point</b>	no data available
<b>Initial boiling point and boiling range</b>	no data available

P06-01310P

<b>Flash point</b>	no data available
<b>Evapouration rate</b>	no data available
<b>Flammability (solid, gas)</b>	no data available
<b>Upper/lower flammability or explosive limits</b>	no data available
<b>Vapour pressure</b>	no data available
<b>Vapour density</b>	no data available
<b>Relative density</b>	no data available
<b>Water solubility</b>	no data available
<b>Partition coefficient: n-octanol/water</b>	no data available
<b>Auto-ignition temperature</b>	no data available
<b>Decomposition temperature</b>	no data available
<b>Viscosity</b>	no data available
<b>Explosive properties</b>	no data available
<b>Oxidizing properties</b>	no data available

## 10. STABILITY AND REACTIVITY

### **Reactivity**

no data available

### **Chemical stability**

Decomposes on exposure to light. Stable under recommended storage conditions

### **Possibility of hazardous reactions**

no data available

### **Conditions to avoid**

no data available

### **Incompatible materials**

Strong oxidizing agents

### **Hazardous decomposition products**

Other decomposition products - no data available

## 11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

**Acute toxicity** no data available

**Skin corrosion/irritation** no data available

**Serious eye damage/eye irritation** no data available

**Respiratory or skin sensitization** no data available

**Germ cell mutagenicity** no data available

**Carcinogenicity**

IARC:

No component of this product present at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.

**Reproductive toxicity** no data available

**Specific target organ toxicity - single exposure** no data available

**Specific target organ toxicity - repeated exposure** no data available

**Aspiration hazard** no data available

**Additional Information**

P06-01310P

RTECS: Not available

To the best of our knowledge, the chemical, physical, and toxicological properties have not been thoroughly investigated.]

### 13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

#### Waste treatment methods

##### Product

Dissolve or mix the material with a combustible solvent and burn in a chemical incinerator equipped with an afterburner and scrubber. Offer surplus and non-recyclable solutions to a licensed disposal company.

##### Contaminated packaging

Dispose of as unused product

### 14. TRANSPORT INFORMATION

#### UN number

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

#### UN proper shipping name

ADR/RID: Not dangerous goods

IMDG: Not dangerous goods

IATA: Not dangerous goods

#### Transport hazard class(es)

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

#### Packaging group

ADR/RID: -

IMDG: -

IATA: -

#### Environmental hazards

ADR/RID: no

IMDG Marine pollutant: no

IATA: no

#### Special precautions for user

no data available

### 12. ECOLOGICAL INFORMATION

#### Toxicity

no data available

#### Persistence and degradability

no data available

#### Bioaccumulative potential

no data available

#### Mobility in soil

no data available

#### Results of PBT and vPvB assessment

no data available

#### Other adverse effects

no data available

### 15. REGULATORY INFORMATION

This safety datasheet complies with the requirements of Regulation (EC) No. 1907/2006.

#### Safety, health and environmental regulations/legislation specific for the substance or mixture

no data available

#### Chemical Safety Assessment

no data available

**Further information**

The above information is believed to be correct but does not purport to be all inclusive and shall be used only as a guide. The information in this document is based on the present state of our knowledge and is applicable to the product with regard to appropriate safety precautions. It does not represent any guarantee of the properties of the product. PAN Biotech GmbH shall not be held liable for any damage resulting from handling or from contact with the above product. See [www.pan-biotech.com](http://www.pan-biotech.com) or reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## ANEXO C. Reactivos y método de preparación del fluido fisiológico simulado (SBF) según Kokubo.

Los reactivos se usan de grado reactivo y en polvo, conservados en desecador.

1. Cloruro de sodio (NaCl)
2. Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>)
3. Cloruro de potasio (KCl)
4. Fosfato hidrógeno dihidrato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O)
5. Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)
6. Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>)
7. Sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
8. Tris hidroximetil amino metano ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>)
9. Ácido clorhídrico 1M-HCl

Para preparar 100mL de SBF se toman 700mL de agua destilada en un beaker plástico sin ralladuras.

Se calienta a 36,5 °C bajo agitación constante y se adicionan uno a uno los reactivos del 1 al 7.

Se adiciona agua destilada hasta completar 900 mL. Adicionar el tris y el ácido clorhídrico se adicionan a necesidad para ajustar el pH. Asegurar que la solución permanezca transparente, sin precipitados, sin olor.

## 8. Bibliografía

- [1] Betts *et al*, “Anatomy y physiology”, 2013. Libro digital Disponible en <http://cnx.org/content>.
- [2] T. J. Webster y E. S. Ahn, “Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone”, *Tissue Eng. II Basics Tissue Eng. Tissue Appl.*, no 103, pp. 275–308, June 2007.
- [3] R. Oftadeh, M. Perez-Viloria, J. C. Villa-Camacho, A. Vaziri y A. Nazarian, “Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review”, *J. Biomech. Eng.*, vol. 137, no. 1, pp. 010802-01802-15, 2014.
- [4] Reznikov, R. Shahar, y S. Weiner, “Bone hierarchical structure in three dimensions,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 9, pp. 3815–3826, 2014.
- [5] F. Gori, L. C. Hofbauer, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg, S. Khosla y B. Lawrence Riggs, “The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated”, *Endocrinology*, vol. 141, no. 12, pp. 4768–4776, 2000.
- [6] E. J. Mackie, “Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture”, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, no. 9, pp. 1301–1305, 2003.
- [7] T. Bellido, L. I. Plotkin y A. Bruzzaniti, “Bone cells”, *Basic Appl. Bone Biol.*, vol. 14, pp. 27–45, 2013.
- [8] S. Harada y G. A. Rodan, “Control of osteoblast function and regulation of bone mass”, *Nature*, vol. 423, no. 6937, pp. 349–355, 2003.
- [9] M. Prideaux, D. M. Findlay y G. J. Atkins, “Science osteocytes: the master cells in bone remodelling”, vol. 28, pp. 24–30, 2016.
- [10] A. T. Díaz *et al.*, “Sustitutos óseos”, *Rev. S. And. Traum. y Ort.*, vol. 26, pp. 2–13, 2008.
- [11] Y. Bala *et al.*, “Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior: an instrumented indentation study”, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 4, no. 7, pp. 1473–1482, 2011.
- [12] E. Kozhemyakina, A. B. Lassar y E. Zelzer, “A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation”, *Development*, vol. 142, no. 5, pp. 817–831, 2015.
- [13] W. Wang y K. W. K. Yeung, “Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review,” *Bioact. Mater.*, vol. 2, pp. 224–247, 2017.
- [14] T. G. Chu, S. S. Liu y W. J. Babler, “Craniofacial biology, orthodontics, and implants” en *Basic and applied bone biology*, librería en línea Elsevier, capítulo 11, primera edición, 2014, pp. 225–242, 2014.
- [15] M. J. Moya-Villaescusa y A. J. Sánchez-Pérez, “Valor pronóstico de la densidad ósea y de la movilidad en el éxito implantológico”, *Rev. Esp. Cir. Oral y Maxilofac.*, vol. 39, no. 3, pp. 125–131, 2017.
- [16] R. F. Ribeiro-Rotta, C. Lindh, A. C. Pereira y M. Rohlin, “Ambiguity in bone tissue characteristics as presented in studies on dental implant planning and placement: a systematic review”, *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 22, no. 8, pp. 789–801, 2011.
- [17] G. Bergkvist, K. Koh, S. Sahlholm, E. Klinström y C. Lindh, “Bone density at implant sites and Its relationship to assessment of bone quality and treatment outcome”, *Int. J. Oral Maxillofac. Implant*, no. March, pp. 321–328, 2009.
- [18] G. Juodzbaly y M. Kubilius, “Clinical and radiological classification of the jawbone anatomy in endosseous dental implant treatment”, *J. Oral Maxillofac. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 1–17, 2013.
- [19] M. G. Araújo y J. Lindhe, “Dimensional ridge alterations following tooth extraction. an experimental study in the dog”, *J. Clin. Periodontol.*, vol. 32, no. 2, pp. 212–218, 2005.
- [20] J. Merheb, M. Quirynen y W. Teughels, “Critical buccal bone dimensions along implant”, *Periodontol. 2000*, vol. 66, no. 1, pp. 97–105, 2014.

- [21] G. Pagni, G. Pellegrini, W. V. Giannobil y G. Rasperini, "Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments", *Int. J. Dent.*, 2012.
- [22] M. Nevins *et al.*, "A study of the fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots", *Int. J. Periodontics Restorative Dent.*, vol. 26, no. 1, pp. 19–29, 2006.
- [23] I. R. Reid, "Anti-resorptive therapies for osteoporosis", *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 473–478, 2008.
- [24] C. Chen *et al.*, "An osteopenic / osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair", vol. 112, no. February, pp. 212–219, 2018.
- [25] K. C. Dee, D. a Puleo, R. Bizios, C. J. Wiley," *Biomaterials*" en *Tissue-biomaterial Interactions an introduction to tissue- biomaterial interactions*, 1<sup>ra</sup> ed., librería en línea Wiley, 2002, capítulo 1, pp 1-11.
- [26] V. Migonney, "Biocompatibility and Norms", en *Biomaterials*, 1<sup>ra</sup> ed., librería en línea Wiley, 2014, capítulo 4, pp. 83–100.
- [27] B. D. Ratner, "Introduction: Biology and medicine - key concepts in the use of biomaterials in surgery and medical devices" en *Biomaterials science. An introduction to materials in medicine*, 3<sup>ra</sup> ed, Waltham, MA; USA: AP Elsevier, 2013, parte 2, sección II.1.1, pp 393.
- [28] Babu RS y Ogle O "Tissue response: biomaterials, dental implants and compromised osseous tissue", *Dent. Clin. N am*, vol. 59, no. 2, pp. 305–315, 2015.
- [29] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castan y J. A. Planell, "Biomaterials in orthopaedics", *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, pp. 1137–1158, 2008.
- [30] R. A. Bhatt y T. D. Rozental, "Bone graft substitutes", *Hand Clin.*, vol. 28, no. 4, pp. 457–468, 2012.
- [31] P. Janicki y G. Schmidmaier, "What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and / or stem cells", *Injury*, vol. 42, pp. S77–S81, 2011.
- [32] V. Macdonald, H. H. Sciences y P. J. Keir, "Grip type alters maximal pinch forces in syringe use", 2002.
- [33] T. Hayashi, "Biodegradable polymers for biomedical uses", *Prog. Polym. Sci.*, vol. 19, no. 4, pp. 663–702, 1994.
- [34] D. Puppi, F. Chiellini, A. M. Piras, y E. Chiellini, "Polymeric materials for bone and cartilage repair", *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 4, pp. 403–440, 2010.
- [35] I. Vroman y L. Tighzert, "Biodegradable polymers", *Materials*, no.2, pp 307-344 2009.
- [36] S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian y J. Huang, "Bioceramics: past, present and for the future", *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 28, pp. 1319–1327, 2008.
- [37] A. Mokhtarzadeh, A. Alibakhshi, M. Hejazi y Y. Omid, "Trends in analytical chemistry bacterial-derived biopolymers: Advanced natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering", *Trends Anal. Chem.*, vol. 82, pp. 367–384, 2016.
- [38] S. H. Teng, E. J. Lee, B. H. Yoon, D. S. Shin, H. E. Kim y J. S. Oh, "Chitosan/nanohydroxyapatite composite membranes via dynamic filtration for guided bone regeneration", *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 88, no. 3, pp. 569–580, 2009.
- [39] F. Chen, Z. C. Wang, y C. J. Lin, "Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials", *Mater. Lett.*, vol. 57, no. 4, pp. 858–861, 2002.



- [40] S. Shokri, B. Movahedi, M. Rafieinia y H. Salehi, "A new approach to fabrication of Cs/BG/CNT nanocomposite scaffold towards bone tissue engineering and evaluation of its properties", *Appl. Surf. Sci.*, vol. 357, pp. 1758–1764, 2015.
- [41] S. Shahriarpanah, J. Nourmohammadi, y G. Amoabediny, "Fabrication and characterization of carboxylated starch-chitosan bioactive scaffold for bone regeneration", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 93, pp. 1069–1078, 2016.
- [42] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito y S. Hofmann, "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering", *Acta Biomater.*, vol. 31, pp. 1–16, 2016.
- [43] H. Xie *et al.*, "A novel bioceramic scaffold integrating silk fibroin in calcium polyphosphate for bone tissue-engineering", *Ceram. Int.*, vol. 42, no. 2, pp. 2386–2392, 2016.
- [44] M. Ribeiro *et al.*, "Antibacterial silk fibroin/nanohydroxyapatite hydrogels with silver and gold nanoparticles for bone regeneration", *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 231–239, 2017.
- [45] W. Xiao *et al.*, "Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels", *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 6, pp. 2384–2393, 2011.
- [46] J. Gonzalez, "Desarrollo de un sustituto óseo inyectable compuesto de carragenina y nanobarras de hidroxiapatita", Ph.D. disertación, programa de Bioingeniería, doctorado en ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, 2018.
- [47] L. Li, R. Ni, Y. Shao y S. Mao, "Carrageenan and its applications in drug delivery", *Carbohydr. Polym.*, vol. 103, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [48] D. J. McHugh, "A guide to the seaweed industry", Documento técnico FAO no. 441. 2003. Disponible en línea. <http://www.fao.org/3/a-y4765e.pdf>. Último acceso abril 30, 2017.
- [49] V. I. Evageliou, P. M. Ryan y E. R. Morris, "Effect of monovalent cations on calcium-induced assemblies of kappa carrageenan", *Food Hydrocoll.*, en impresión, 1-5, 2018.
- [50] V. L. Campo, D. F. Kawano, D. B. da Silva y I. Carvalho, "Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review", *Carbohydrate Polymers*. No 77(2), pp167-180 2009.
- [51] M. Vallet-Regí y J. M. González-Calbet, "Calcium phosphates as substitution of bone tissues", *Prog. Solid State Chem.*, vol. 32, no. 1–2, pp. 1–31, 2004.
- [52] G. Daculsi, B. H. Fella y T. Miramond, "The essential role of calcium phosphate bioceramics in bone regeneration "en *Advances in calcium phosphate biomaterials*" vol. 2, librería en línea Springer link, 2014, capítulo 4, pp. 71-96.
- [53] S. V. Dorozhkin, "Biphasic, triphasic, and multiphasic calcium orthophosphates", *Adv. Ceram.*, vol. 8, no. 3, pp. 33–95, 2016.
- [54] P. Fernigrini, O. R. Cámara y F. Y. Oliva, "Síntesis y caracterización de distintas apatitas. Su utilización como biomaterial", *Asoc. Argentina Mater.*, vol. 10, pp. 1–5, 2008.
- [55] J. G. Claudia García y Carlos Paucar, "Study of some parameters that determine the synthesis of hydroxyapatite by the precipitation route", *Dyna*, vol. 73, no. 148, pp. 9–15, 2006.
- [56] M. P. Ferraz, F. J. Monteiro y C. M. Manuel, "Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies", *J. Appl. Biomater.*, vol. 2, no. 2, pp. 74–80, 2004.
- [57] K. Lin y J. Chang, "Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications", parte uno, capítulo 1, Librería en línea Elsevier Ltd., 2015, pp 3-19.

- [58] R. Z. Legeros and B. Ben-nissan, "Introduction to synthetic and biologic apatites" en *Advances in calcium phosphate biomaterials*, vol. 2, librería en línea Springer link, 2014, capítulo 1, pp. 1–17.
- [59] D. Fuoco, "Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs", *Antibiotics*, vol. 1, no. 1, pp. 1–13, 2012.
- [60] W. Guerra, P. P. Silva-Caldeira, H. Terenzi y E. C. Pereira-Maia, "Impact of metal coordination on the antibiotic and non-antibiotic activities of tetracycline-based drugs", *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 327–328, pp. 188–199, 2016.
- [61] M. R. Acharya, J. Venitz, W. D. Figg y A. Sparreboom, "Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases", *Drug Resist. Updat.*, vol. 7, no. 3, pp. 195–208, 2004.
- [62] M. L. Nelson, "Chemical and biological dynamics of tetracyclines", *Adv. Dent. Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 5–11, 1998.
- [63] A. N. Sapadin y R. Fleischmajer, "Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications", *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 54, no. 2, pp. 258–265, 2006.
- [64] J. Gross y C. M. Lapierre, "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 48, no. 6, pp. 1014–1022, 1962.
- [65] L Golub *et al* (19996). Fomento de la cicatrizacion de heridas mediante tetraciclinas modificadas químicamente, ES2255107T3, En línea en <https://patents.google.com/patent/ES2255107T3>.
- [66] L Golub *et al*. (1989). Una composicion para el tratamiento de mamiferos que padecen de artritis reumatoide, ES2055309T3, En línea en <https://patents.google.com/patent/ES2055309T3>.
- [67] Normal L Block *et al* (1997). Compuestos de tetraciclina para el tratamiento de ciertos tipos de cancer, ES2262221T3. En línea en <https://patents.google.com/patent/ES2262221T3>.
- [68] Abranson S y Amin A (1997), Tetraciclinas no antibacterianas para el tratamiento de la esclerosis multiple, ES2310018T3, En línea en <https://patents.google.com/patent/ES2310018T3>.
- [69] L. Golub *et al* (1989). Composition comprising fluriprofen and effectively non-antibacterial tetracycline to reduce bone loss, US5321017A. En línea en <https://patents.google.com/patent/US5321017A>
- [70] L. Golub *et al* (1998). Combinación de bifosfonatos y tetraciclina, L. Golub *et al* (1998). Combinación de bifosfonatos y tetraciclina, US5321017A. En línea en <https://patents.google.com/patent/US5321017A>. En línea en <https://patents.google.com/patent/ES2237945T3>.
- [71] L Golub *et al*. (1998). Uso de derivados de tetraciclina para potenciar la produccion de interleucina 10, ES2258854T3, En línea en <https://patents.google.com/patent/ES2258854T3>
- [72] L. Golub *et al*. (1983). Use of tetracycline to enhance bone protein synthesis and/or treatment of osteoporosis, US4925833A, En línea en <https://patents.google.com/patent/US4925833A>.
- [73] L. M. Golub *et al.*, "Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes: preliminary observations and a proposed new mechanism of action", *J. Periodontal Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 516–526, 1983.
- [74] S. Bain, N. S. Ramamurthy, T. Impeduglia, S. Scolman, L. M. Golub y C. Rubin, "Tetracycline

prevents cancellous bone loss and maintains near-normal rates of bone formation in streptozotocin diabetic rats”, *Bone*, vol. 21, no. 2, pp. 147–153, 1997.

[75] J. B. Payne y L. M. Golub, “Using tetracyclines to treat osteoporotic/osteopenic bone loss: from the basic science laboratory to the clinic”, *Pharmacol. Res.*, vol. 63, no. 2, pp. 121–129, 2011.

[76] T. Sasaki, N. Ohyori, K. Debari, N. S. Ramamurthy y L. M. Golub, “Effects of chemically modified tetracycline, CMT-8, on bone loss and osteoclast structure and function in osteoporotic states”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 878, pp. 347–360, 1999.

[77] J. T. Bettany, N. M. Peet, R. G. Wolowacz, T. M. Skerry, y P. S. Grabowski, “Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts”, *Bone*, vol. 27, no. 1, pp. 75–80, 2000.

[78] S. G. Holmes, K. Still, D. J. Buttle, N. J. Bishop y P. S. Grabowski, “Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors”, *Bone*, vol. 35, no. 2, pp. 471–478, 2004.

[79] Y. Gu *et al.*, “Non-antibacterial tetracyclines modulate mediators of periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: a mechanistic link between local and systemic inflammation”, *Pharmacol. Res.*, vol. 64, no. 6, pp. 573–579, 2011.

[80] K. Kirkwood, T. Martin, S. T. Andreadis y Y. J. Kim, “Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability”, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, no. 9, pp. 1809–1819, 2003

[81] R. G. Craig *et al.*, “A chemically modified tetracycline inhibits streptozotocin-induced diabetic depression of skin collagen synthesis and steady-state type I procollagen mRNA”, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1402, no. 3, pp. 250–260, 1998.

[82] T. Sasaki, N. S. Ramamurthy y L. M. Golub, “Tetracycline administration increases collagen synthesis in osteoblasts of streptozotocin-induced diabetic rats: a quantitative autoradiographic study”, *Calcif. Tissue Int.*, vol. 50, pp. 411–419, 1992.

[83] P. S. Gomes y M. H. Fernandes, “Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells”, *Arch. Oral Biol.*, vol. 52, no. 3, pp. 251–259, 2007.

[84] S. H. Jin, H. Y. Kweon, J. B. Park y C. H. Kim, “The effects of tetracycline-loaded silk fibroin membrane on proliferation and osteogenic potential of mesenchymal stem cells”, *J. Surg. Res.*, vol. 192, no. 2, pp. E1–E9, 2014.

[85] Y. J. Park *et al.*, “Enhanced guided bone regeneration by controlled tetracycline release from poly(L-lactide) barrier membranes”, *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 391–397, 2000.

[86] S.-B. Lee, D.-Y. Lee, Y.-K. Lee, K.-N. Kim, S.-H. Choi y K.-M. Kim, “Surface modification of a guided tissue regeneration membrane using tetracycline-containing biodegradable polymers”, *Surf. Interface Anal.*, vol. 40, no. December 2007, pp. 192–197, 2008.

[87] P. M. Sipos, B. G. Loos, F. Abbas, M. F. Timmerman y U. Van Der Velden, “The combined use of enamel matrix proteins and a tetracycline-coated expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane in the treatment of intra-osseous defects”, *J. Clin. Periodontol.*, vol. 32, no. 7, pp. 765–772, 2005.

[88] N. Panith, A. Assavanig, S. Lertsiri, M. Bergkvist, R. Surarit y N. Niamsiri, “Development of tunable biodegradable polyhydroxyalkanoates microspheres for controlled delivery of tetracycline for treating periodontal disease”, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 133, no. 42, pp. 1–12, 2016.

[89] K. Marycz *et al.*, “Multifunctional nanocrystalline calcium phosphates loaded with Tetracycline antibiotic combined with human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs)”, *Mater.*

*Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 17–26, 2016.

[90] K. Madhumathi y T. S. Sampath Kumar, “Regenerative potential and anti-bacterial activity of tetracycline loaded apatitic nanocarriers for the treatment of periodontitis”, *Biomed. Mater.*, vol. 9, no. 3, 2014.

[91] T. Nagasawa, M. Arai y A. Togari, “Inhibitory effect of minocycline on osteoclastogenesis in mouse bone marrow cells”, *Arch. Oral Biol.*, vol. 56, no. 9, pp. 924–931, 2011.

[92] L. M. Golub, R. T. Evans, T. F. McNamara, H. M. Lee y N. S. Ramamurthy, “A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats.”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 732, no. 1, pp. 96–111, 1994.

[93] L. M. Golub, H.-M. Lee, M. E. Ryan, W. V. Giannobile, J. Payne y T. Sorsa, “Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms”, *Adv. Dent. Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 12–26, 1998.

[94] P. A. L. Go, A. J. Smolka y M. Go, “Epithelial and bacterial metalloproteinases and their inhibitors in *H. pylori* infection of human gastric cells”, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* vol. 29425, pp. 823–832, 2018.

[95] Y. S. Kim y T. H. Joh, “Matrix metalloproteinases, new insights into the understanding of neurodegenerative disorders”, *Biomol. Ther.*, vol. 20, no. 2, pp. 133–143, 2012.

[96] T. Klein y R. Bischoff, “Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases”, *Amino Acids*, vol. 41, no. 2, pp. 271–290, 2011.

[97] C. J. Malemud, “Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview”, *Front. Biosci.*, pp. 1696–1701, 2006.

[98] I. Chopra and M. Roberts, “Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 65, no. 2, pp. 232–260, 2001.

[99] M. Rydlova *et al.*, “Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases”, *Anticancer Res.*, vol. 28, no. 2B, pp. 1389–1397, 2008.

[100] J. Martel-Pelletier, D. J. Welsch y J. P. Pelletier, “Metalloproteinases and inhibitors in arthritic diseases”, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 15, no. 5, pp. 805–829, 2001.

[101] S. P. Turunen, O. Tatti-Bugaeva y K. Lehti, “Membrane-type matrix metalloproteinases as diverse effectors of cancer progression”, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1864, no. 11, pp. 1974–1988, 2017.

[102] G. Malgieri y G. Grasso, “The clearance of misfolded proteins in neurodegenerative diseases by zinc metalloproteinase an inorganic perspective.pdf”, vol. 260, pp. 139–155, 2014.

[103] R. Visse y H. Nagase, “Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry”, *Circ. Res.*, vol. 92, no. 8, pp. 827–839, 2003.

[104] Y. Zayani *et al.*, “Inflammations mediators and circulating levels of matrix metalloproteinases: Biomarkers of diabetes in Tunisians metabolic syndrome patients”, *Cytokine*, vol. 86, pp. 47–52, 2016.

[105] C. Y. He, X. Q. Gao y L. P. Jiang, “The impact of smoking on levels of chronic periodontitis-associated biomarkers”, *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 101, no. 1, pp. 110–115, 2016.

[106] N. Dutzan, M. Hernández, P. Pozo, O. Rivera, A. Oyarzún y A. Dezerega, “Efecto del tratamiento periodontal no quirúrgico en los niveles de MMP-2 y TIMP-2 en periodontitis crónica”, *Rev. Clínica Periodoncia, Implantol. y Rehabil. Oral*, vol. 2, no. 2, pp. 68–72, 2009.

[107] D. Maugeri *et al.*, “Interleukin-18 (IL-18) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in post-menopausal osteoporosis”, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, vol. 40, no. 3, pp. 299–305, 2005.

[108] V. Homem y L. Santos, “Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous

- matrices- a review". *J. Environ. Manage.*, vol. 92, no. 10, pp. 2304–2347, 2011.
- [109] P. Feng *et al.*, "The interaction of MMP-2/B7-H3 in human osteoporosis", *Clin. Immunol.*, vol. 162, pp. 118–124, 2016.
- [110] B. Rai, J. Kaur, R. Jain y S. C. Anand, "Levels of gingival crevicular metalloproteinases-8 and -9 in periodontitis", *Saudi Dent. J.*, vol. 22, no. 3, pp. 129–131, 2010.
- [111] García CA., tesis de maestría en ciencias-química, "Síntesis de nanopartículas de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  y  $\text{Al}_2\text{O}_3$  para el desarrollo de sólidos porosos de interés biomédico", facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Antioquia, 2009.
- [112] T. Kokubo y H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [113] American Type Culture Collection, "MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide," Components, vol. 6597, pp. 1–6, 2011.
- [114] D. Francisco Arencibia Arrebola, L. Alfredo Rosario Fernández, D. Lazara Curveco Sánchez, "Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad", *Retel*, pp 40-52, 2003.
- [115] R. P. Illeperuma *et al.*, "Immortalized gingival fibroblasts as a cytotoxicity test model for dental materials", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 23, no. 3, pp. 753–762, 2012.
- [116] M. Buitrago-Vásquez, J. I. González-Ocampo, y C. P. Ossa-Orozco, "Evaluación de los métodos de centrifugación y de tratamiento hidrotermal para la obtención de nanopartículas de fosfatos de calcio", *Ing. y Compet.*, vol. 19, no. 1, pp. 109–118, 2017.
- [117] A. Chandrasekar, S. Sagadevan, y A. Dakshnamoorthy, "Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique", *International journal of physical sciences*, 8(32), pp 1639-1645, 2013.
- [118] F. A. Menezes *et al.*, "Hydroxyapatite and a new fibrin sealant derived from snake venom as scaffold to treatment of cranial defects in rats", *Materials Research*, vol. 18, no. 1, pp. 196–203, 2015.
- [119] E. Gómez-Ordóñez y P. Rupérez, "FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds", *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 6, pp. 1514–1520, 2011.
- [120] L. Pereira, "Population studies and carrageenan properties of *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae, Rhodophyta) Population studies and carrageenan properties of *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus* (Gigartinaceae, Rhodophyta)", *Journal of Applied Phycology*, no 16, pp 369-383, 2004.
- [121] E. Tojo and J. Prado, "Chemical composition of carrageenan blends determined by IR spectroscopy combined with a PLS multivariate calibration method", *Carbohydr. Res.*, vol. 338, no. 12, pp. 1309–1312, 2003.
- [122] V. Webber, S. M. de Carvalho, P. J. Ogliari, L. Hayashi, and P. L. M. Barreto, "Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology", *Food Sci. Technol.*, vol. 32, no. 4, pp. 812–818, 2012.
- [123] G. J. Manuhara, D. Praseptiangga, and R. A. Riyanto, "Extraction and Characterization of Refined K-carrageenan of Red Algae [ *Kappaphycus alvarezii* (Doty ex P. C. Silva, 1996)] Originated from Karimun Jawa Islands", *Aquatic Procedia*, vol. 7, pp. 106–111, 2016.
- [124] C. Deka, M. Dutta, D. Deka, and D. K. Jha, "Study of olive oil-loaded chitosan / carrageenan coacervate and its antibacterial property", *Internattionall Journall of Pharma Sciienes*, vol 6 (3), 2016.
- [125] Murat S y E. N. Erboz, "Determination of critical gelation conditions of j -carrageenan by viscosimetric and FT-IR analyses", *Food Research International* vol. 43 (5), pp. 1361–1364, 2010.
- [126] Pereira, A. T. Critchley y A. M. Amado, "A comparative analysis of phycocolloids produced by underutilized versus industrially utilized carrageenophytes (Gigartinales, Rhodophyta)", pp. 599–605, 2009.
- [127] P. Volery, R. Besson y C. Schaffer-Lequart, "Characterization of commercial carrageenans by Fourier transform infrared spectroscopy using single-reflection attenuated total reflection", *J. Agric.*

Food Chem., vol. 52, no. 25, pp. 7457–63, 2004.

[128] Industrias Cp Kelco. “El libro del carragenano”, Documento digital. Disponible en <https://www.cpkelco.com>.

[129] L. Pereira, S. F. Gheda y P. J. A. Ribeiro-claro, “Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries”, vol. 2013, no. vi, pp. 1–7, 2013.

[130] S. Gjoseva et al., “Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 186, pp. 260–272, 2018.

[131] R. Kassab, P. Yammine, D. Moussa, N. Safi, y P. Yammine, “Microspheres containing doxycycline: properties and in vitro study”, no. October, 2017.

[132] A. C. Kogawa yH. R. Nunes, “Doxycycline: a review of Properties, applications, and analytical methods”, *Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 11–25, 2012.

[133] Y. Junejo y M. Safdar, “Highly effective heterogeneous doxycycline stabilized silver nanocatalyst for the degradation of ibuprofen and paracetamol drugs”, *Arab. J. Chem.*, 2015.

[134] M. Petrescu, R. A. Mitran, A. M. Luchian, C. Matei y D. Berger, “Mesoporous ceria-silica composites as carriers for doxycycline”, *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.*, vol. 77, no. 3, pp. 13–24, 2015.

[135] R. Cesar *et al.*, “Axial compressive strength of human vertebrae trabecular bones classified as normal, osteopenic and osteoporotic by quantitative ultrasonometry of calcaneus”, vol. 33, no. 2, pp. 91–96, 2017.

[136] D. Guede *et al.*, “Biomechanics and bone: basic concepts”, *Rev. Osteoporos. Metab. Miner.*, no 5(1) pp. 43–50, 2013.

[137] M. Bohner y G. Baroud, “Injectability of calcium phosphate pastes”, *Biomaterials*, vol. 26, no. 13, pp. 1553–1563, 2005.

[138] J. Zhang *et al.*, “A simple and effective approach to prepare injectable macroporous calcium phosphate cement for bone repair: syringe-foaming using a viscous hydrophilic polymeric solution”, *Acta Biomater.*, vol. 31, pp. 326–338, 2016.

[139] N. Neves *et al.*, “Strontium-rich injectable hybrid system for bone regeneration”, *Mater. Sci. Eng. C.*, vol. 59, pp. 818–827, 2016.

[140] R. O’Neill *et al.*, “Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements”, *Acta Biomater.*, vol. 50, pp. 1–19, 2017.

[141] J. Krebs, S. J. Ferguson, M. Bohner, G. Baroud, T. Steffen y P. F. Heini, “Clinical Measurements of Cement Injection Pressure During Vertebroplasty”, *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 30, no. 5, pp. E118–E122, 2005.

[142] B. Song, Ho-Yeon; Rahman A.H; Lee, “Fabrication of calcium phosphate-calcium sulfate injectable bone substitute using chitosan and citric acid”, *J Mater Sci Mater Med*, pp. 935–941, 2009.

[143] R. Dorati *et al.*, “In vitro characterization of an injectable in situ forming composite system for bone reconstruction”, *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 119, pp. 151–158, 2015.

[144] A. A. Zadpoor, “Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials”, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 35, pp. 134–143, 2014.

[145] Macário J *et al.*, “Bioactivity and cytotoxicity of glass and glass – ceramics based on the 3CaO Á P 2 O 5 – SiO 2 – MgO system”, *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 24(9)

[146] RL. Oréfice, L. L. Hench, and A. B. Brennan, “In vitro bioactivity of polymer matrices reinforced with a bioactive class phase”, vol. 11, no. 1, pp. 78–85, 2000.

[147] M. Bohner y J. Lemaitre, “Biomaterials Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?”, *Biomaterials*, vol. 30, no. 12, pp. 2175–2179, 2009.

[148] L. N. Mombelli Andrea, McNabb Hal, “Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. I topographic distribution in the human dentition”, *J. Periodont Res*, vol. 26, pp. 301–307, 1991.

- [149] K. Sato, T. Yoneyama, H. Okamoto, G. Dahle, y L. J. The, "The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota", *J Clin Periodontol*, no.20, pp. 359–365, 1993.
- [150] Larsen T., "Susceptibility of porphyromonas gingivalis in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole," no. 17, pp. 267–271, 2002.
- [151] R Ramirez-Agudeo *et al* "Hybrid nanofibers based on poly-caprolactone/gelatin/hydroxyapatite nanoparticles-loaded Doxycycline: Effective anti-tumoral and antibacterial activity", *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Feb 1;83:25-34
- [152] Martínez J, Xibillé D y Montiel J, "Posible papel de porphyromonas gingivalis en el desarrollo de la artritis reumatoide", *ADM*, vol. 73, no. 5, pp. 235–240, 2016.
- [153] D. Grenier, E. Roy y D. Mayrand, "Proteinase activity by suboptimal doses of antimicrobial agents", vol. 74, no. 9, pp. 1316–1319.
- [154] S. M. Olate Sergio, "Antimicrobianos locales en periodoncia: revisión de la literatura", *Acta Odontol. Venez.*, vol. 3, pp. 1–9, 2007.
- [155] Potempa J, Banbula A y Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses", *Periodontol 2000*, no24, pp 153-92, 2000.
- [156] Bostanci N y Belibasakis GN, "Doxycycline inhibits TREM-1 induction by Porphyromonas gingivalis", *FEMS Immunol Med Microbiol*, no.66(1), pp.7-44, 2012
- [157] A. J. Van Winkelhoff, R. J. Goene, C. Bensch, y T. Folmer, "Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients", *Clin. Oral Impl. Res.*, no. 11, pp. 511–520, 2000.
- [158] Ardila C.M, "Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica", *Av. Periodon Implantol.*, no.22, 1: 27-35, 2010.
- [159] Ercan E, Dalí M y Yavuz Y, "Investigation of microorganisms in infected dental roots", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*,20:2, 166-172, 2014.
- [160] I. Zografos, I. Maistrelis, A. Sabatakakis y E. Chrysomali, "Escherichia coli and Enterococcus spp. isolation in maxillary osteomyelitis: a case report and literature review with special consideration of immunocompetent individuals", *Oral Surgery*, pp. 187–193, 2014.
- [161] T. Phaechamud y J. Charoentearaboon, "Antibacterial activity and drug release of chitosan sponge containing doxycycline Hyclate", *AAPS Pharm.Sci. Tech*, vol. 9, no. 3, pp. 8–14, 2008.
- [162] Y. Yu, C. Xu, y H. Dai, "Preparation and characterization of a degradable magnesium phosphate bone cement", *Regen. Biomater.*, vol. 3, no. 4, pp. 231–237, 2016.
- [163] Organización de estándares internacionales ISO. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- [164] H. Liu, H. Li, W. Cheng, Y. Yang, M. Zhu y C. Zhou, "Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials", *Acta Biomater.*, vol. 2, no. 5, pp. 557–565, 2006.
- [165] M. H. Kim, B. S. Kim, H. Park, J. Lee y W. H. Park, "Injectable methylcellulose hydrogel containing calcium phosphate nanoparticles for bone regeneration", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 57–64, 2018.
- [166] D. B. Friedman, S. Hoving y R. Westermeier, Capítulo 30 Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis, primera edición, Elsevier inc, vol. 463, 2009.
- [167] J. Marin, J. A. ZEE, y R. Kouaoui, "Effect of hydrocolloids on potential availability of calcium", *Lait*, vol 7, no. 5-6, pp. 467–473, 1990.
- [168] A. H. Caswell, "Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate", vol. 43, no. 3, 1971.
- [169] D. Grenier, M. Huot y D. Mayrand, "Iron-chelating activity of tetracyclines and its impact on the susceptibility of actinobacillus actinomycetemcomitans to these antibiotics," vol. 44, no. 3, pp. 763–766, 2000.