

Prótesis en artroplastia total de cadera y recubrimientos bioactivos de quitosano para mejorar su desempeño

Zujur, D.^{1,2}, Álvarez-Barreto, J.F.^{2,3,¶}

¹ *Laboratorio de Ingeniería de Tejidos Humanos. Área de Salud. Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Valle de Sartenejas, Caracas. Venezuela.*

² *Departamento de Ciencias de los Materiales. Universidad Simón Bolívar. Valle de Sartenejas, Caracas Venezuela*

³ *Grupo de Biotecnología. Universidad Estatal de Milagro. Secretaría Nacional para Educación Superior, Ciencia y Tecnología, SENESCYT. Proyecto Prometeo, Ecuador.*

Resumen—La artroplastia total de cadera (ATC) es un procedimiento común en el campo de la traumatología. Esta consiste en la sustitución o el reemplazo de la cadera por un sistema predominantemente metálico en los casos en que los principales componentes de la articulación han sido afectados de manera irreversible. Entre los metales más comúnmente utilizados en prótesis de ATC se encuentra el titanio y sus aleaciones, en especial Ti6Al4V debido a sus óptimas propiedades mecánicas y resistencia a la corrosión. Estas prótesis pueden ser cementadas y no-cementadas, cada una con ventajas y desventajas prácticas, pero con limitaciones comunes como la susceptibilidad a las infecciones, la poca capacidad de osteointegración y la alta dependencia a la técnica quirúrgica empleada por el médico. Particularmente, el crecimiento del hueso en la superficie del implante se ha promovido bien sea creando rugosidad superficial o mediante recubrimientos de fosfatos cálcicos como la hidroxiapatita, logrando de esta manera aumentar la vida útil de las prótesis, aunque aun no lo suficiente para evitar cirugías posteriores (artroplastia de revisión) especialmente para pacientes jóvenes. Es por esto que se proponen recubrimientos bioactivos a partir de biopolímeros. El quitosano, polímero natural que se obtiene a partir del exoesqueleto de crustáceos, destaca entre los más utilizados para este fin debido a que su estructura química le confiere adecuada biocompatibilidad y versatilidad para ser combinado con otras sustancias o moléculas. Los recubrimientos a base de quitosano se han desarrollado a través de interacciones físicas por inmersión, capas polielectrolíticas utilizando polímeros naturales aniónicos, y la creación de enlaces covalentes por el método de silanización el cual permite activar la superficie oxidada del metal con monómeros de silicio que contienen al menos un enlace carbono-silicio y que son altamente reactivos con biomoléculas. Los recubrimientos de quitosano también han sido utilizados para la encapsulación y liberación controlada de factores de crecimiento y diferenciación, confiriéndoles no solo una bioactividad sino osteoinductividad en la interfase metal-tejido, permitiendo la deposición de matriz extracelular ósea y finalmente el crecimiento de hueso en la

superfície del implante. Dados los numerosos estudios realizados, los recubrimientos de quitosano tienen un futuro promisorio en aplicaciones prácticas de cirugía ortopédica. Específicamente, este artículo describe los recubrimientos de quitosano como una alternativa viable para la problemática actual asociada a la pobre osteointegración de componentes metálicos en la ATC.

Palabras Clave— Artroplastia total de cadera; prótesis; quitosano; recubrimiento.

PROSTHESES IN TOTAL HIP ARTHROPLASTY AND CHITOSAN BIOACTIVE COATINGS TO IMPROVE THEIR PERFORMANCE

Abstract—Total hip arthroplasty (THA) is a common procedure in traumatology. It consists in the substitution or replacement of the hip by a predominantly metallic system in the cases in which the main joint components have been irreversibly affected. Among the most widely used metals in THA prostheses, titanium and its alloys are found, especially Ti6Al4V due to its optimal mechanical properties and resistance to corrosion. These prostheses can be cemented or non-cemented, each one with advantages and disadvantages, but with common problems such as susceptibility to infection, poor osseointegration and high dependence on the surgical technique. In particular, the growth of bone into the implant surface has been promoted through either surface roughness or by creating coatings of calcium phosphates such as hydroxyapatite, thus achieving increases in the life of the prosthesis, but still not enough to avoid subsequent surgeries (revision arthroplasty) especially for young patients. In this sense, biopolymer-based bioactive coatings have been proposed. Chitosan, obtained from crustacean cytoskeleton, stands out among the polymers used for this purpose due its chemical structure that allows it to have appropriate biocompatibility, and versatility to be combined with other substances or molecules. Chitosan-based coatings have been developed through physical interactions by immersion, polyelectrolyte layers using anionic natural polymers, and the creation of covalent links via silanization, which activates the metal surface with silicon monomers containing at least one biomolecules highly reactive carbon-silico bond. These coatings have also been used to encapsulate growth and differentiation factors, conferring them not only bioactivity but also osseointegrativity at the metal-tissue interface allowing bone extracellular matrix deposition onto the implant surface. Due to the numerous studies carried out, it can be said that polymeric coatings have a promising future in orthopedic surgery. Specifically, this article describes the chitosan coatings as a feasible alternative to the current problem associated to the poor osseointegration of metallic components in the THA.

Keywords—Total hip arthroplasty; Prosthesis; Chitosan; Coating;

PRÓTESE EM ARTROPLASTIA TOTAL DE QUADRIL E QUITOSANA BIOATIVOS REVESTIMENTOS PARA MELHORAR O DESEMPENHO

Resumo—A artroplastia total do quadril (ATQ) é um procedimento comum na área de traumatologia. Este é o sistema de substituição de substituição ou de quadril para predominantemente de metal nos casos em que os principais componentes da articulação são afetados de forma irreversível. Entre a prótese mais utilizada é ATC metais titânio e suas ligas, particularmente TÍ6Al4V por causa das suas excelentes propriedades mecânicas e de resistência à corrosão. Estas próteses podem ser cimentadas e não-cimentadas, cada um com vantagens e desvantagens práticas, mas com limitações comuns, tais como a susceptibilidade à infecção, má capacidade de osseointegração e alta dependência da técnica cirúrgica utilizada pelo médico. Particularmente o crescimento ósseo na superfície do implante tenha sido promovida quer a criação de rugosidade da superfície ou por revestimento de fosfatos de cálcio, tais como hidroxapatita, conseguindo assim aumentar a vida útil da prótese, embora ainda não é suficiente para evitar posteriores cirurgias (artroplastia de revisão), especialmente para pacientes jovens. É por isso proposta revestimentos bioativos de biopolímeros. O quitosano, um polímero natural que é derivado do exoesqueleto de crustáceos, destaca-se entre os mais amplamente utilizados para este fim, porque a sua estrutura química proporciona biocompatibilidade e versatilidade adequada para ser combinado com outras substâncias ou moléculas. Os revestimentos à base de quitosano têm sido desenvolvidos através de camadas de polieletrólito interações físicas de imersão utilizando polímeros naturais aniônicos, e criação de ligações covalentes pelo método de silanização que activa a superfície de metal oxidado com monómeros contendo silício pelo menos uma ligação carbono-silício e que são altamente reactivos com ligação biomoléculas. Revestimentos de quitosano também foram utilizados para a encapsulação e controlada factores de crescimento e diferenciação de libertação, não só confere bioatividade mas osteoindutividade na interface metal-tecido, permitindo a deposição de matriz extracelular óssea e finalmente o crescimento do osso em superfície do implante. Tendo em conta os numerosos estudos, revestimentos de quitosana tem um futuro promissor em aplicações práticas de cirurgia ortopédica. Especificamente, este artigo descreve revestimentos de quitosana como uma alternativa viável para os problemas actuais associados à má osseointegração de componentes metálicos no ATC.

Palavras chave— artroplastia de quadril, prótese, revestimento de quitosana

I. INTRODUCCIÓN

Los metales y las aleaciones metálicas son utilizados para la fabricación de prótesis e implantes para diferentes aplicaciones óseas. Dentro de estos, resaltan el titanio y sus aleaciones (Ti6Al7Nb, Ti6Al4V, Ti3Al2.5V) que se encuentran dentro de los materiales más exitosos utilizados en cirugía dental e implantes ortopédicos [1]. Sin embargo, los metales se integran de manera pasiva con el hueso debido a su naturaleza bio-inerte, lo cual puede provocar el aflojamiento de la prótesis o del implante y su subsecuente falla [2]. Una consecuencia directa de este problema es una o varias cirugías posteriores que afectan la calidad de vida del paciente y que inclusive podrían limitar el completo restablecimiento de la funcionalidad de la articulación.

Es necesario entonces inducir la formación de tejido óseo a nivel de la interfase implante-tejido a través de modificaciones superficiales promoviendo así el proceso de osteo-integración. Esto depende directamente de las interacciones celulares con la superficie del implante (adhesión), así como la capacidad de proliferación y diferenciación de las células progenitoras que intervienen en la osteogénesis [3].

II. METALES EN APLICACIONES ÓSEAS

Los metales empleados como biomateriales son pocos en comparación con los encontrados en la tabla periódica donde más de las tres cuartas partes son elementos metálicos. Éstos deben cumplir con ciertos requisitos que no todos satisfacen y que dependen de la aplicación a la que vayan a ser destinados [4-6]. En general los metales son utilizados para aplicaciones que requieran soportar carga y una de las más importantes las componen los implantes empleados como sustitutos óseos, entre ellos se pueden mencionar prótesis de codo, hombro, cadera, rodilla, tibia, tobillo, etc. En cualquier caso, las condiciones de partida que se deben asegurar con el uso de metales son las de ser biocompatibles y poseer una determinada vida media.

Otro requisito también indispensable es que tengan buena resistencia a la corrosión. La corrosión es un problema general de todos los metales, más aún si están inmersos en un medio hostil como es el cuerpo humano, y a temperaturas del orden de los 37°C [6]. Así, el estudio de la proporción de formación y composición de la película de óxido formada espontáneamente en la superficie de los biomateriales metálicos es importante a los efectos de esta consideración; y debe ser estudiada teórica y clínicamente. El hecho de que un metal sea pasivo no significa que este no pueda corroerse, pero sí que la proporción de corrosión es significativamente reducida. Bajo condiciones experimentales estas proporciones pueden ser aceptables; pero en las condiciones bajo las cuales los implantes funcionan,

esta baja proporción puede producir reacciones adversas en los tejidos; así mismo las tensiones pueden producir una combinación de efectos del medio ambiente y mecánicos en el metal, cambiando sus propiedades y las propiedades de los óxidos de la superficie. Así, la corrosión es un fenómeno de alta importancia debido no solo a la evidente toxicidad que generan sus productos sino también a que reducen la resistencia mecánica de material lo cual acarrearía la falla del dispositivo implantado [6].

Por lo anterior, el número de materiales metálicos que pueden ser utilizados como biomateriales se reduce a solo unos pocos, dentro de los que se destacan las aleaciones de cobalto, los aceros inoxidable, el titanio y sus aleaciones.

Particularmente, el titanio y algunas de sus aleaciones han generado un creciente interés en el campo de los biomateriales para el reemplazo de tejidos duros, debido a sus propiedades mecánicas, baja densidad, resistencia a la corrosión y biocompatibilidad, estos resultan en materiales con características superiores cuando se les comparan con los aceros inoxidable y aleaciones de cobalto. Entre las aleaciones de titanio más utilizadas en aplicaciones ortopédicas y dentales, se encuentra el Ti6Al4V, cuyo mecanismo de biocompatibilidad puede ser explicado a través de la formación espontánea de una capa de óxido en su superficie que minimiza la liberación de iones a partir del implante hacia los tejidos circundantes y por lo tanto disminuyendo la posibilidad de reacciones inflamatorias en el cuerpo [7,8]. Esta película de óxido es de unos pocos nanómetros (~ 5 nm) y está compuesta principalmente por TiO_2 , además de contener pequeñas cantidades de TiO , Ti_2O_3 y Al_2O_3 [9].

III. ARTROPLASTIA TOTAL DE CADERA

La cadera es entendida como una articulación congruente en la cual el acetábulo y la cabeza femoral poseen una simetría que permite la rotación alrededor de un eje simplificando la acción de los músculos. Cuando este sistema natural es reemplazado por una prótesis, el éxito de la cirugía depende de factores relacionados con el paciente como edad, sexo, altura/peso, historia médica, condición de la cadera subyacente y la existencia de cirugías previas. También influyen en este caso los factores quirúrgicos como la experiencia del cirujano ortopédico, el enfoque quirúrgico, el diseño de la prótesis, orientación de los componentes, desigualdad en la longitud de los miembros, y la existencia de no-unión trocánterea [10]. Por lo tanto, la evaluación misma del desempeño de la prótesis utilizada se hace difícil. De cualquier modo, la vida útil promedio de una prótesis de cadera se estima que es, en el mejor de los casos, 20 años. Así, debido a la problemática existente en torno a éstas, se ha trabajado constantemente en el desarrollo de tecnologías que involucran consideraciones

de diseño los implantes, selección de materiales y el uso de herramientas de ingeniería de tejidos para promover la osteointegración de los componentes [11].

La artroplastia total de cadera (ATC) es un procedimiento común en el campo de la traumatología. Esta consiste en la sustitución o el reemplazo de la cadera por un sistema predominantemente metálico en los casos en que los principales componentes de la articulación han sido afectados de manera irreversible [12].

La ATC se realiza principalmente en pacientes con osteoartritis, la forma más común de artritis, e inicialmente se caracteriza por la degradación del cartilago articular el cual frecuentemente termina por afectar el hueso subyacente. Pacientes con diferentes severidades de osteoartritis presentan dolor en la articulación, sin embargo, se estima que un 40% de los pacientes no presentan ninguna manifestación a pesar poseer evidencia radiológica de daño en la articulación [13]. Adicionalmente, en pacientes jóvenes la artrosis de cadera se relaciona casi universalmente con un trastorno mecánico subyacente. Esta afección mecánica los predispone a sufrir inestabilidad dinámica, sobrecarga localizada o pinzamiento de la articulación, o una combinación de todos ellos [14].

Además de la osteoartritis, también existen otras patologías que pueden desembocar en ATC o en la sustitución parcial de la cadera, como artritis reumatoide (que produce dolor, rigidez e inflamación), necrosis avascular (debilitamiento óseo causado por una defectuosa irrigación sanguínea), artritis traumática, fracturas confirmadas no resolutivas, tumores óseos benignos y malignos (que suelen conducir a una fractura o discontinuidad ósea), artritis asociada a enfermedad de Paget, espondilitis anquilosante y artritis reumatoide juvenil [15]. El objetivo en todos los casos es alivio del dolor y mejora de la función articular. Así, en una reunión de consenso llevada a cabo en 1994 [16], se consideró que la ATC era una opción para casi todas aquellas patologías que, afectando a la articulación de la cadera, provoquen una dificultad funcional crónica de la articulación.

Así, para hacer frente a la degeneración tisular y restablecer su funcionalidad después de una afección, se han diseñado prótesis de cadera constituidas por: el vástago, cabeza femoral artificial y el acetábulo, los cuales deben desempeñar las funciones del fémur, la cabeza femoral y acetábulo natural o cótilo, respectivamente.

Tipos de prótesis de cadera

De acuerdo al tipo de fijación de sus componentes, las prótesis de cadera se pueden clasificar en prótesis cementadas o no cementadas.

En el caso de prótesis cementadas, la fijación en el canal femoral se realiza a través del uso de cemento óseo (polimetilmetacrilato, PMMA). Su uso se justifica porque éste permite ser moldeado para su aplicación en los componentes a fijar y su vez es capaz de polimerizar a temperatura ambiente (polimerización en frío) al cabo de unos minutos. Este material se considera como el material por excelencia para la fijación de prótesis de ATC cementadas [17].

El fracaso del componente femoral en una ATC con una prótesis cementada, se ha relacionado con un aflojamiento del vástago debido a un proceso de fatiga en la interfase hueso/cemento en el cual tanto el factor mecánico como el biológico contribuyen en la vida útil de la prótesis [18]. Se ha determinado que dos de los problemas más comunes en dicha interfase son: la necrosis térmica que ocurre durante la polimerización ya que el proceso de entrecruzamiento del PMMA involucra una reacción altamente exotérmica, y la necrosis química debida a la liberación de monómeros cuando la reacción no es llevada a cabo por completo [19]. También, como se ha mencionado, el éxito de una ATC es dependiente de muchos factores. Con el uso del cemento óseo se deben tomar en cuenta variables como por ejemplo la viscosidad del cemento óseo al momento de su aplicación, ya que afecta la tasa de penetración del mismo en el hueso trabecular donde se aloja y, a su vez, determina la interfase cemento-hueso [20]. Sin embargo, desde finales de 1990 han surgido nuevas técnicas de cementación como la incorporación de injerto óseo durante el proceso que han informado que resulta en una tasa de falla de 10% en periodos de hasta 10 años [21]. Sin embargo, el origen del injerto óseo trae consigo factores de riesgo adicionales como dolor en el sitio de la extracción cuando proviene de un hueso sano del mismo paciente (autoinjerto) o posible rechazo si el injerto proviene de un hueso donado (aloinjerto).

En las no cementadas, el posicionamiento del vástago no requiere el uso de ningún material adicional entre el hueso y el implante para su retención. Desde 1980 el concepto de prótesis no cementada fue introducido promoviendo la fijación biológica por parte del hueso sobre el implante [22].

El uso de prótesis no cementadas presenta la limitación de que no pueden ser usadas en todos los pacientes. La indicación es sólo para pacientes con buena calidad ósea, frecuentemente jóvenes, debido a que se espera que el crecimiento del hueso sobre la prótesis asegure su estabilidad y evite su aflojamiento, especialmente en el componente femoral. En este sentido, las consideraciones en el uso de prótesis no cementadas se reducen a consideraciones de la superficie del implante para promover la osteointegración [10]. Éstas se explican en el siguiente apartado.

En el caso del componente acetabular, también aplican estas clasificaciones, la copa acetabular puede ser fijada al

hueso mediante el cemento óseo o en su defecto a través de tornillos sin la presencia del PMMA. La selección del modo de fijación a utilizar en una ATC es decidida por el médico tratante según ciertos factores de los cuales el más determinante es la calidad ósea del paciente [23]. Así, un médico puede decidir cementar o no, uno o los dos componentes que requieren fijación en hueso (el vástago y el acetábulo).

Superficie de las prótesis

Es bien conocido que la primera reacción de un tejido vivo en contacto con cualquier biomaterial es la activación del sistema inmune (respuesta inflamatoria), la cual puede desembocar en el rechazo del componente debido a reacciones de cuerpo extraño. La aceptación biológica de estos materiales es controlada esencialmente por las reacciones con su superficie [24]. La superficie de un material no es solo el fin de un sustrato, es la zona de interacción con otras sustancias (líquidas, sólidas o gaseosas) que posee características únicas asociadas a la variación de la actividad que esta presenta. La actividad de una superficie puede variar por acción mecánica, química, térmica, física, o combinaciones de éstas. La superficie juega un papel crucial en la interacción biológica debido a varias razones: 1. La superficie del material es la única parte en contacto directo con los tejidos vivos. 2. La región superficial es por lo general diferente en morfología y composición al volumen del material. 3. Algunas propiedades propias de la superficie como la topografía afectan su interacción con los tejidos circundantes [7,8].

En prótesis de ATC, existe la limitación de que los biomateriales de los componentes de reemplazo deben atender altas solicitudes mecánicas para las cuales solo los materiales metálicos satisfacen este requisito, comprometiendo en mayor medida las interacciones de superficie que podrían ofrecer otros tipos de materiales como algunas cerámicas bioactivas o polímeros, factor de especial importancia sobre todo en prótesis no cementadas. Así, es necesaria la funcionalización de la superficie para promover la osteointegración y evitar el aflojamiento de la prótesis y su consecuente falla [1].

La adhesión celular a la superficie de un implante no cementado tiene un papel importante en la osteointegración del mismo. Existen dos tipos de interacción celular, la célula-célula y célula-sustrato. En la adhesión célula-sustrato, las células tienden a vincularse a través de las proteínas de la matriz extracelular adsorbidas sobre la superficie del sustrato. Los fibroblastos, células madre mesenquimales, y los osteoblastos son dependientes de este tipo de anclaje, requieren la formación de tales sitios de adhesión para sobrevivir. La adhesión celular es mediada por varios tipos de proteínas asociadas con el citoesqueleto de la célula, tales como las integrinas. Uno de

los mecanismos de la adhesión celular implica su adhesión a las proteínas utilizando pequeños complejos altamente organizados conocidos como contactos focales, centros de adherencias, o placas de adhesión [25].

Actualmente, se consideran dos enfoques que se pueden aplicar de manera aislada o en combinación para bioactivar las superficies metálicas, estos son: tratamientos superficiales para modificar la topografía y la aplicación de recubrimientos bioactivos.

Topografía de la superficie

La modificación de la topografía de la superficie es una técnica utilizada actualmente no solo para las prótesis no cementadas, sino también para las cementadas. En esta última modalidad, una superficie con mayor rugosidad aumenta el área de contacto entre la prótesis y el cemento óseo lo cual garantiza una mejor fijación del componente al hueso. Sin embargo, en las prótesis cuya fijación es no cementada, la topografía de la superficie determina el éxito del reemplazo articular.

La estructura de la superficie influye en la respuesta ósea a nivel macro, micro y en escala nanométrica. Ya a principios de la década de 1980, la estructura de la superficie fue identificada como uno de los factores particularmente importantes para incorporación del implante en el hueso, una declaración que ha sido confirmada en todas las investigaciones posteriores. La formación más rápida y de huesos más fuertes puede conferir una mejor estabilidad durante el proceso de curación [26]. Hay numerosos informes que demuestran que la rugosidad de la superficie de los implantes metálicos afecta la tasa de osteointegración y la fijación biomecánica de prótesis no cementadas [26,27]. Por otra parte, para implantes que posteriormente serán recubiertos, una rugosidad adecuada provee un sustrato óptimo para el anclaje mecánico mejorando la adhesión entre el recubrimiento y la superficie [28].

El nivel de macrorugosidad está directamente relacionado con tratamientos superficiales que dan como resultado una superficie rugosa de hasta 10 μ m. Se ha demostrado que tanto la fijación anticipada y estabilidad mecánica a largo plazo de la prótesis puede ser mejorada con un perfil de rugosidad a nivel micrométrico en comparación con las superficies lisas. Sin embargo, una rugosidad exagerada puede aumentar el riesgo de perimplantitis o alguna fuga iónica [27]. No existe consenso de rugosidad óptima sin embargo algunas investigaciones sugieren un valor aproximado de rugosidad media (Ra) de 4 μ m [29-32].

La topografía de la superficie en el rango nanométrico también desempeña un papel importante sobre todo en la adsorción de proteínas, la adherencia de las células osteoblásticas y por lo tanto la tasa de osteointegración. Sin embargo, el mecanismo de nanoabsorción selectiva

de proteínas aún es no se conoce con exactitud [27]. Adicionalmente, generar rugosidad en escala nanométrica aumentaría considerablemente los costos de producción de las prótesis dificultando su comercialización.

III. RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS BIOACTIVOS BIOPOLÍMEROS

Biopolímeros

Los polímeros ya sean de origen natural o sintético, representan el grupo de biomateriales más utilizados debido a que presentan características atractivas como biodegradabilidad y biocompatibilidad [33,34]. Además, su gran versatilidad permite que a través de una adecuada combinación de estructuras y dependiendo del tipo de polímero, se pueda obtener una gran variedad de propiedades según la aplicación [35].

Los polímeros pueden ser combinados y modificados por medio de reacciones químicas como sustitución selectiva, copolimerización y entrecruzamiento para ser moldeados de diferentes formas. Por ejemplo, los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales formadas a partir de monómeros altamente hidrofílicos e insolubles que son entrecruzados por enlaces covalentes o fuerzas electrostáticas [36].

Estos polímeros absorben grandes cantidades de agua. El resultado es una red elástica en donde el agua ocupa los espacios intersticiales y que cuando son inmersos en medio acuoso, se reticular asumiendo su estructura final de red hidratada. El hidrogel puede, en consecuencia, fácilmente cambiar su tamaño y la forma en respuesta a los estímulos externos y esta es una de sus características intrínsecas [36, 37].

Entre los polímeros más novedosos y de mayor uso en aplicaciones de regeneración de tejidos se encuentra el quitosano (QT). Éste es un polisacárido de origen natural obtenido principalmente de la desacetilación de la quitina, biopolímero abundante que se encuentra en el exoesqueleto (concha) de crustáceos marinos y paredes celulares de hongos [38,39]. Los estudios sobre quitosano como biomaterial se han intensificado en los últimos 25 años. En ingeniería de tejido óseo, éste ha sido ampliamente utilizado, debido a una bioactividad relacionada con la presencia de fracciones de N-acetilglucosamina en el QT. De hecho, los oligosacáridos del QT tienen un efecto estimulante sobre los macrófagos y son quimiotácticos para los neutrófilos tanto *in vitro* como *in vivo* [39,40]. De igual manera, el QT posee una alta capacidad antibacteriana, adecuada degradabilidad, la posibilidad de funcionalización con diversas moléculas bioactivas debido a la disponibilidad de diferentes grupos funcionales (aminas e hidroxilos) en su estructura molecu-

lar y la facilidad de ajustar perfiles de liberación controlada de estas biomoléculas [41]. Un enfoque prometedor es la introducción de proteínas de señalización tales como las proteínas morfogenéticas (BMP) que juegan un papel importante en la formación de hueso y cartílago, en el QT. Entre los miembros de la familia BMP, la BMP-2 ha demostrado ser uno de los factores de crecimiento más eficaces para mejorar la formación de hueso *in vivo* [42].

Otra ventaja que ofrece el QT es que puede ser depositado sobre superficies metálicas a través de varias técnicas, entre ellas se encuentran: la adsorción, el ensamblaje iónico y enlaces covalentes [43]. Este último método es el más eficaz en cuanto a adhesión entre QT y el sustrato metálico (parámetro fundamental para el buen desempeño del recubrimiento); sin embargo, es el más costoso y complicado en términos químicos y prácticos, debido a que involucra el uso adicional de una molécula de unión entre la superficie metálica y el quitosano [44], lo cual dificulta su aplicación en quirófano.

Recientemente, algunos grupos de investigadores han trabajado en la modificación del quitosano con sustancias fotoactivas a fin de crear un material foto-sensible; en una modificación de dos etapas, la primera para aumentar la solubilidad del quitosano a pH neutro y la segunda para producir el foto-entrecruzamiento, es posible obtener un hidrogel. Hasta ahora, estos hidrogeles han sido utilizados como adhesivo biológico de los tejidos blandos, para liberación controlada de drogas inyectables y más recientemente como recubrimiento [45-49, 72].

Recubrimientos bioactivos

Originalmente, las prótesis de ATC se fabricaban de metales altamente resistentes a la corrosión, hoy en día muchas casas comerciales producen prótesis metálicas con recubrimientos de materiales bioactivos, principalmente con hidroxiapatita [50].

Los métodos utilizados para deposición de recubrimientos de hidroxiapatita ha sido objeto de estudio por numerosos investigadores porque de ello depende la estabilidad de la capa apatítica y posteriormente del hueso sobre el metal. Entre ellos se pueden mencionar procesos de sol-gel, electrodeposición, precipitación biomimética, láser, pulverización catódica, entre otras técnicas [51-57].

Sin embargo, dos problemas surgen cuando se intenta recubrir metales con materiales cerámicos. Por un lado, los coeficientes de expansión térmica de la cerámica y el metal son generalmente muy diferentes, y como resultado, grandes esfuerzos térmicos se generan durante procesamiento. Estas tensiones pueden conducir a grietas en la interfase y comprometer la adherencia del recubrimiento. Además, pueden ocurrir reacciones químicas entre la cerámica y metal que debilitan el metal en las cercanías de la interfaz, re-

duciendo la fuerza de adhesión del sistema. Este problema es particularmente importante cuando el recubrimiento se realiza sobre aleaciones de Ti, debido a su alta reactividad con la mayoría de los óxidos de los materiales [5].

A nivel de investigación, se ha estado estudiando el uso de otros materiales para su uso como recubrimiento que estimule la migración celular y crecimiento del hueso sobre metales. Los sistemas de metal-polímero, en especial los biodegradables, más aún si estos son de origen natural, parecen ser una buena alternativa para mejorar la osteointegración de prótesis en ATC [38,39]. Por otra parte, la ingeniería de tejidos humanos ofrece una fuente terapéutica prometedora que involucra la aplicación de recubrimientos biodegradables para la liberación controlada de algunos factores de crecimiento que promueven el proceso de osteogénesis en la superficie del implante o el uso de células procedentes de la médula ósea debido a que se conoce que éstas pueden diferenciarse en varios linajes para lograr la formación de hueso y cartílago [58].

Quitosano como Recubrimiento sobre sustratos metálicos

El quitosano altamente desacetilado (más de 80%), ha sido ampliamente utilizado para la elaboración de recubrimientos debido a que éste se relaciona con bajas tasas de degradación. La degradación del quitosano en el cuerpo humano se realiza principalmente por acción enzimática e hidrólisis. La eliminación de los grupos acetilo de las unidades de glucosamina permite un empaquetamiento más estricto y un aumento de la cristalinidad de la cadena del biopolímero que limitan el acceso de las enzimas [41].

Un factor que determina el buen desempeño de cualquier recubrimiento es la fuerza con que éste se adhiere al sustrato. El quitosano posee la ventaja de que puede ser enlazado a las superficies metálicas mediante dos métodos: adsorción e interacción química.

Bajo el mecanismo de adsorción, la naturaleza policaiónica del quitosano le permite interactuar electrostáticamente con superficies de carga opuesta; así, el quitosano puede ser adsorbido fácilmente por la superficie metálica de un implante debido a que ésta posee carga aniónica a pH corporal [39].

Esta característica también permite el desarrollo de recubrimientos en multicapas; en éstos se realiza un arreglo de capas alternas de quitosano y algún polielectrolito de carga opuesta. Este es un método económico y sencillo puesto que la deposición se hace a través de sucesivas inmersiones de los sustratos en las soluciones cargadas [60].

En este sentido, Ruan Q. y col., 2009, obtuvieron capas alternas de heparina y quitosano sobre placas de silicio y Ti6Al4V a través de un simple proceso de inmersión

durante 15 minutos en cada una de las soluciones de polielectrolitos; la repetición de este procedimiento resultó en un recubrimiento multifuncional que combina el efecto anti-coagulante de la heparina con las propiedades antibacterianas del quitosano [61]. Kaiyong C. y col (2008), utilizaron quitosano y poli (sulfonato de estireno) para depositar una fina película de 13 capas autoensambladas electrostáticamente sobre superficies de titanio. Ellos encontraron que los sustratos recubiertos por las multicapas de electrolitos arrojaron resultados más favorables que los del control en los ensayos *in vitro* realizados con osteoblastos: proliferación celular, viabilidad celular, síntesis de ADN y la actividad de fosfatasa alcalina.

Poh C. y col. (2008), lograron funcionalizar una superficie de titanio a través de la deposición de multicapas de electrolitos de ácido hialurónico y quitosano. Se realizaron ensayos *in vitro*, para los cuales se utilizaron células osteoblásticas de ratas de la línea celular MC3T3-E1. Se obtuvo que la composición de la capa más externa del recubrimiento tiene gran influencia en la adhesión celular en la superficie, mostrando resultados más significativos en cuanto a esta característica, en las superficies cuya capa exterior era la de quitosano. Adicionalmente, estos resultados mejoraron cuando en el quitosano fue inmovilizado con un péptido que contenía arginina-glicina-aspartico (RGD) [62]. Ésta es una secuencia específica de proteínas de adhesión celular como la fibronectina o la vitronectina que son de vital importancia en la mediación de la adhesión de los osteoblastos. También se pudo observar que para esta última condición, tanto la proliferación como la función de los osteoblastos (evaluada a través de la actividad de la fosfatasa alcalina) se incrementaron. La función antibacteriana también fue evaluada a través del cultivo de *Staphylococcus aureus*, el patógeno más común encontrado en las infecciones ortopédicas. Se determinó que las bacterias se adhirieron fácilmente a la superficie de titanio prístino, mientras que para las superficies funcionalizadas con y sin inmovilización del péptido, la adhesión fue escasa.

Por otra parte, algunos recubrimientos multicapas de polielectrolitos son utilizados para ejercer una función contraria a la que se ha mencionado hasta ahora de promover el la regeneración de tejido sobre implantes metálicos. Tal es el caso de los empleados sobre los stents endovasculares, los cuales deben evitar la adhesión y la agregación plaquetaria a fin de que impedir la formación de trombos y el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria. Thierry B. y col. (2003), emplearon quitosano y ácido hialurónico para la fabricación de un recubrimiento de polielectrolitos sobre discos de NiTi. Bajo estas condiciones, ellos encontraron que hubo una disminución de la adhesión plaquetaria en ensayos *in vitro* (38% de reducción; $p = 0.036$) [63].

Meng S. y col. (2009), también usaron quitosano pero combinado con heparina para la elaboración de un

recubrimiento multicapas sobre acero inoxidable diseñado para acelerar la re-endotelización y el proceso de curación después de la implantación de stents coronarios. Los resultados de los ensayos *in vitro* a través del cultivo de células porcinas endoteliales, apoyaron dicha función. Adicionalmente, realizaron ensayos *in vivo* de modelo porcino de lesión coronaria y de cortocircuito arteriovenoso, cuyos resultados demostraron que este recubrimiento superficial promueve de manera significativa la re-endotelización y la propiedad anticoagulante de los stents [64].

Shin J. y col. (2010), desarrollaron un novedoso recubrimiento bioactivo que consiste en un híbrido de xerogel de sílice (que contenía calcio y fósforo) y quitosano sobre superficies de titanio. La deposición se llevó a cabo a través de un proceso de sol-gel a temperatura ambiente. Las células osteoblásticas cultivadas en los recubrimientos se mostraron más viables que cultivadas sobre las superficies de control. Por otra parte, la actividad de la fosfatasa alcalina de las células fue significativamente más alta, el nivel más alto fue alcanzado cuando la capa contenía un 30% de quitosano (%v/v) [65].

También es posible incorporar una variedad de sustancias que favorecen la formación de tejidos, tales como factores de crecimiento y diferenciación, que pueden ser liberadas controladamente conforme avanza el proceso de degradación del QT [39].

Otra característica de gran importancia para el uso del quitosano como recubrimiento es su alta actividad antibacteriana contra un amplio espectro de bacterias, éste puede reducir la tasa de infección por *Staphylococcus aureus*, el patógeno microbiano más común encontrado en las infecciones ortopédicas [66-69].

Otros investigadores han prestado especial interés en la síntesis de quitosano modificado para mejorar su solubilidad a pH neutro o incluso en condiciones alcalinas. Xu X. y col. (2010), utilizaron quitosano con hidroxipropiltrimetil de cloruro de amonio (HACC), con un grado de sustitución del 18%, para la fabricación de un recubrimiento sobre muestras de Ti6Al4V. El quitosano modificado conservó su propiedad antibacteriana evaluada *in vitro* con *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. También se encontró que el HACC posee baja citotoxicidad para la línea celular L929 (fibroblastos de ratón) y no interfirió con la proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales [70]. Por otra parte, Zujur D. y col. modificaron químicamente el quitosano con ácido lactobiónico y ácido azidobenzoico lo cual permitió aumentar su solubilidad a pH corporal y otorgarle un carácter foto-sensible, respectivamente. Las soluciones de quitosano obtenidas se utilizaron para recubrir, bajo la modalidad de adsorción, superficies de Ti6Al4V; posteriormente una corta exposición a luz UV permitió el foto-entrecruzamiento *in situ* del recubrimiento y su

evolución a un hidrogel. La biocompatibilidad y la funcionalidad del recubrimiento obtenido fueron demostradas *in vitro* a través del cultivo y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales de médula ósea [72].

Bajo el mecanismo de interacción química, también se han realizado numerosas investigaciones. La unión entre el quitosano y el sustrato metálico se realiza a través de una molécula de unión, generalmente de silano (ej. Aminopropiltriétoxosilano), que reacciona tanto con el metal como con el QT proporcionando una alta adhesión [67].

Bumgardner J. y col. (2007), estudiaron el comportamiento de implantes de titanio recubiertos con quitosano vía anclaje de silano, en la tibia de 16 conejos blancos (varones adultos) de Nueva Zelanda. Las evaluaciones histológicas de los tejidos en contacto con estos implantes mostraron una mínima respuesta inflamatoria y una secuencia normal de curación: formación de tejido fibroso y óseo. Estas observaciones fueron similares a la de los tejidos puestos en contacto con los implantes de control, recubiertos con fosfato de calcio y los de titanio prístino [59]. La importancia de este resultado radica en la posibilidad de utilizar los recubrimientos de quitosano para proporcionar un vehículo eficaz para la entrega de agentes bioactivos tales como antibióticos o factores de crecimiento que faciliten la osteointegración.

En este sentido, el quitosano al ser combinado con proteínas morfogenéticas óseas (BMP2, BMP7), las cuales se han inmovilizado previamente en otros materiales como colágeno, ácido hialurónico, hidroxiapatita porosa, gelatinas, entre otros [68,71]; ha tenido resultados satisfactorios como recubrimiento de superficies metálicas. Shi Z. y col. (2009), lograron funcionalizar covalentemente la superficie de Ti6Al4V, con quitosano carboximetilado BMP-2 obteniendo una diferenciación a osteoblastos a partir del cultivo de células madre mesenquimales [68].

Por otra parte, Martin H. y col. (2007) realizaron un estudio para determinar si el tratamiento superficial del sustrato metálico tenía alguna influencia en la deposición de un recubrimiento de quitosano, esto es porque aún no existe consenso entre las características de la superficie y los tratamientos que se le realizan a los implantes metálicos de las distintas casas comerciales. Así, utilizaron espectroscopía de rayos X de fotoelectrones (XPS) para estudiar las etapas de reacción del quitosano con la superficie de dos muestras de titanio tratadas químicamente por dos vías distintas: con ácido nítrico, con ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno. La composición de la superficie de las películas de quitosano para los dos tratamientos fue estadísticamente similar, lo que demostró que el quitosano podría ser utilizado como recubrimiento al menos en superficies tratadas con los reactivos ensayados sin afectar su capacidad de enlace [67].

IV. CONCLUSIÓN

De acuerdo a la base de datos de PubMed, el quitosano cuenta con 8479 artículos indexados durante los últimos 5 años. En este sentido, resulta lógico pensar que este biomaterial representa una fuente de gran potencial medico en diferentes aplicaciones. Estudios recientes demuestran que, en general, el quitosano es un material seguro en términos de citotoxicidad, biocompatible y con capacidad antibacterial intrínseca. Específicamente como material base para el desarrollo de recubrimientos osteoinductivos, el quitosano y sus derivados han sido ampliamente investigados demostrando resultados satisfactorios en combinación con moléculas bioactivas u otros materiales. Sin embargo, aún existen varias consideraciones que se deben tomar en cuenta para materializar su uso en aplicaciones prácticas de la cirugía ortopédica: La necesidad de modificaciones químicas bien sea para contrarrestar la pobre solubilidad a pH neutro del quitosano o para combinarlo con otro material o molécula, podrían resultar en productos intermedios o sustancias sin reaccionar que podrían ser citotóxicas. También, es necesario llevar a cabo estudios in vivo con controles adecuados que puedan corroborar la capacidad de los recubrimientos de quitosano para inducir la formación de tejido óseo en la interfase metal-organismo. Por otra parte, es importante considerar que las características del quitosano, que podrían afectar su actividad biológica, dependen ampliamente de un número considerable de variables como su peso molecular, grado de desacetilación, forma estructural, entre otras. En conclusión, partiendo de las consideraciones mencionadas para futuras investigaciones, el quitosano podría convertirse en un biomaterial de amplio uso comercial.

REFERENCIAS

- [1]. Navarro M., Michiardi A., Castaño O., Planell J. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society, Interface*, 5, 1137-1158, 2008.
- [2]. Bacchi A., Paludo L., Ferraz M., Schuh C., Federizzi L., Oro Spazzin A. Loosening torque of prosthetic screws in metal-ceramic or metal-acrylic resin implant-supported dentures with different misfit levels. *J Biomech*, 46, 1358-1362, 2013.
- [3]. Hazan R., Sreekantan S., Abdul A. Surface Engineering of Titania for Excellent Fibroblast 3T3 Cell-Metal Interaction. *J. Phys. Sci*, 20, 35-47, 2009.
- [4]. Aparicio C. Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales. Universidad Politécnica de Catalunya. Tesis doctoral, 2004.
- [5]. Kalpana K. Biomaterials in total joint replacement. *Colloid. Surface. B*, 39, 133-142, 2004.
- [6]. Bohórquez L., Rodríguez D. Biomateriales y biomecánica en los implantes oseointegrados. *ODOUS científica*, 4, 45-56, 2003.
- [7]. Balza J.C., Zujur D., Del Vasto P., and Alvarez-Barreto, J.F. Behavior of Alumina Particles During Sandblasting in the Preparation of Ti-6Al-4V Implant Surfaces for the Deposition of Bioactive Coatings. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 45, 012004, 2013.
- [8]. Oshida Y. Elsevier, 2013. Bioscience and Bioengineering of Titanium Materials. Implant Application. Capítulo 8, 225-268.
- [9]. Pacha M., Gallardo A., Vadillo V., González M., Pérez C., Galván J. Electrochemical analysis of the UV treated bactericidal Ti6Al4V surfaces. *Mater. Sci. Eng. C-Biomim*, 33, 1789-1794, 2013.
- [10]. Dastgir N., Saddique A., Maccabe J.P. Total Hip Arthroplasty: risk factors for dislocation of hip. *The Professional Medical Journal*, 18, 317-322, 2011.
- [11]. Gianluca M. Support for Total hip replacement: structures modeling, gait data analysis and report. *European Journal Translational Myology - Basic Applied Myology*, 22, 69-121, 2012.
- [12]. Williams S., Bachison C., Michelson J., Manner P. Component position in 2-incision minimally invasive total hip arthroplasty compared to standard total hip arthroplasty. *J. Arthroplasty*, 23, 197-202, 2008.
- [13]. Aranda-Villalobos P., Fernández C., Navarro-Espigares J., Hernández-Torres E., Villalobos M., Arendt-Nielsen L., Arroyo M. Normalization of widespread pressure pain hypersensitivity after total hip replacement in patients with hip osteoarthritis is associated with clinical and functional improvements. *Arthritis. Rheum*, 65, 1262-1270, 2013.
- [14]. Parvizi J., Campfield A., Clohisy J., Rothman R., Mont M. El tratamiento de la artrosis de cadera en adultos jóvenes. *J. Bone. Joint Surg*, 6, 20-26, 2007.
- [15]. Fernández M. Editorial Vitoria-Gasteiz, Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, 1999. Prótesis de Cadera: Indicaciones de Uso Apropiado. Informe n°: Osteba E-99-08.
- [16]. NIH Consensus Statements. Total hip replacement. NIH Consensus Statement Online, 1994.
- [17]. Schade V., Roukis T. The Role of Polymethylmethacrylate Antibiotic-loaded Cement in Addition to Debridement for the Treatment of Soft Tissue and Osseous Infections of the Foot. *J. Foot. Ankle. Surg*, 49, 55-62, 2010.
- [18]. Yang D., Zhang D., Arola D. Fatigue of the bone/cement interface and loosening of total joint replacements. *Int. J. Fatigue*, 32, 1639-1649, 2010.
- [19]. Stanczyka M., Rietbergen B. Thermal analysis of bone cement polymerisation at the cement-bone interface. *J. Biomech*, 37, 1803-1810, 2004.
- [20]. Waanders D., Janssen D., Mann K., Verdonschot N. The mechanical effects of different levels of cement penetration at the cement-bone interface. *J. Biomech*, 43 1167-1175, 2010.
- [21]. Bardou-Jacquet J., Souillac V., Mouton A., Chauveaux D. Primary aseptic revision of the femoral component of a cemented total hip arthroplasty using a cemented technique without bone graft. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 95, 243-248, 2009.
- [22]. Shin-Yoon K., Do-Heon K., Chang-Wug O., Poong-Taek K., Joo-Chul I., Suk-Young K. Total hip arthroplasty with the use of nonmodular cementless acetabular component. *J. Arthroplasty*, 20, 632-638, 2005.
- [23]. Weinrauch P., Bell C., Wilson L., Goss B., Lutton C., Crawford R. Shear Properties of Bilaminar Polymethylmethacrylate Cement Mantles in Revision Hip Joint Arthroplasty. *J. Arthroplasty*, 22, 394-403, 2007.
- [24]. Mahendra G., Pandit H., Kliskey K., Murray D., Gill H., Athanasou N. Necrotic and inflammatory changes in metal-on-

- metal resurfacing hip arthroplasties. Relation to implant failure and pseudotumor formation. *Acta. Orthop*, 80, 653-659, 2009.
- [25]. Harris L., Patterson L., Bacon C., Gwynn I., Richards R. Assessment of the cytocompatibility of different coated titanium surfaces to fibroblasts and osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 73, 12-20, 2005.
- [26]. Wennerberg A., Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin. Oral. Impl. Res.*, 20, 172-184, 2009.
- [27]. Le Gu'ehennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.*, 23, 844-854, 2007.
- [28]. Lira-Olivares J. CRC. Handbook of Metallurgical Process Design. 2004. Capitulo 21, 857-917.
- [29]. Ranolda H., Lyngstadaas S., Ellingsen J. Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. *Biomaterials*, 24, 4559-4564, 2003.
- [30]. Lincks J., Boyan B., Blanchard C., Lohmann C., Liu Y., Cochran D., Dean D., Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19, 2219-2232, 1998.
- [31]. Dohle J., Becker W., Braun M. Bone remodelling along a titanium hip arthroplasty stem after resection of a chondrosarcoma. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.*, 122, 291-294, 2002.
- [32]. De Monserrat I., Risa I., Hiroki K., Ichiro T., Naoko Y., Toshi-ichiro T., Kuntteru N., Masahiko M. Dental Implant Surface Roughness and Topography: A Review of the Literature. *J. Gifu. Dent. Soc.*, 35, 89-95, 2009.
- [33]. Alvarez Barreto, J.F. Regeneración Ósea a través de la Ingeniería de Tejidos: Una Introducción. *Revista de Estudios Transdisciplinarios RET*, 1, 98-107, 2009.
- [34]. Holzwartha J., Ma P. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 32, 9622-9629, 2011.
- [35]. Sabir M., Xu X. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J. Mater. Sci.*, 44, 5713-5724, 2009.
- [36]. Guiseppi-Elie A. Electroconductive hydrogels: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Biomaterials*, 31, 2701-2716, 2010.
- [37]. Tomatsu I, Peng K, Kros A. Photoresponsive hydrogel for biomedical applications. *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 63, 1257-1266, 2011.
- [38]. Lárez C. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1, 15-21, 2006.
- [39]. Di Martino A., Sittinger M., Risbud M. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26, 5983-5990, 2005.
- [40]. Sivoli L., Perez E., Caraballo D., Rodríguez J.P., Rodríguez D., Moret J., Sojo F., Arvelo F., Tapia M., Colina M., and Alvarez-Barreto, J.F. Cytocompatibility of a matrix of methylated cassava starch and chitosan. *Journal of Cellular Plastics*, 49, 508-520, 2013
- [41]. Bumgardner J., Chesnutt B., Yuan Y., Yang Y., Appleford M., Oh S., McLaughlin R., Elder S., Ong J. The Integration of Chitosan-Coated Titanium in Bone: An *In Vivo* Study in Rabbits. *Implant. Dent.*, 16, 66-79, 2007.
- [42]. In Y., Seog-Jin S., Hyun-Seuk M., Mi-Kyong Y., In-Young P., Bom-Chol K., Chong-Su C. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.*, 26, 1-21, 2008.
- [43]. Jiang T., Kumbar S., Nair L., Laurencin C. Biologically Active Chitosan Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 354-364, 2008.
- [44]. Holly M., Kirk S., Bumgardner J., Walters K. XPS Study on the Use of 3-Aminopropyltriethoxysilane to Bond Chitosan to a Titanium Surface. *Langmuir*, 23, 6645-6651, 2007.
- [45]. Ono K., Saito Y., Yura H., Ishikawa K., Kurita A., Akaike T., Ishihara M. Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *J. Biomed. Mater. Res.*, 49, 289-295, 2000.
- [46]. Jameela S., Lakshmi S., Nirmala R., Jayakrishnan A. Preparation and evaluation of photocrosslinkable chitosan as a drug delivery matrix. *J. Appl. Polym. Sci.*, 86, 1873-1877, 2000.
- [47]. Bin-Hong T., Lin C., Lin J. Synthesis and Property Evaluations of Photocrosslinkable Chitosan Derivative and its Photocopolymerization with Poly(ethylene glycol). *J. Appl. Pol.*, 100, 1794-1801, 2006.
- [48]. Hattori H., Amano Y., Nogami Y., Takase B., Ishihara M. Hemostasis for Severe Hemorrhage with Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel and Calcium Alginate. *Ann. Biomed. Eng.*, 38, 3724-3732, 2010.
- [49]. Yihua Y., Xianglan L., Houwei T., Sha X., Hua Z. Preparation and swelling kinetics of pH-sensitive photocrosslinked hydrogel based on carboxymethyl chitosan. *J Polym Res.*, 17, 471-479, 2010.
- [50]. Hanawa T. An overview of biofunctionalization of metals in Japan. *Acta. Biomater.*, 8, 3532-3540, 2012.
- [51]. Hsu H., Wu S., Fu C., Ho W. Formation of calcium phosphates on low-modulus Ti-7.5Mo alloy by acid and alkali treatments. *J. Mater. Sci.*, 45, 3661-3670, 2010.
- [52]. Wang H., Chen C., Wang D. Effect of heating rate on structure of HA coating prepared by sol-gel. *Surf. Eng.*, 25, 131-135, 2009.
- [53]. Lusquiños F., Pou J., Arias J., Boutinguiza M., León B., Pérez-Amor M. Production of calcium phosphate coatings on Ti6Al4V obtained by Nd: yttrium-aluminum-garnet laser cladding. *J. Appl. Phys.*, 90, 4231-4236, 2001.
- [54]. García C., Ceré S., Durán A. Recubrimientos bioactivos sobre aleaciones de titanio depositados por la técnica sol-gel. *Revista Facultad de Ingeniería.*, 37, 129-140, 2006.
- [55]. Fatehi K., Moztafzadeh F., Solati-Hashjin M., Tahriri M., Rezvannia M., Saboori A. Biomimetic hydroxyapatite coatings deposited onto heat and alkali treated Ti6Al4V surface. *Surface. Eng.*, 25, 583-588, 2009.
- [56]. Yang C., Lui T. Microstructural Healing With Interfacial Reaction Layers On The Adhesive Strength Enhancement Of Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings. *Int. J. Mod. Phys. B.*, 24, 76-84, 2010.
- [57]. Hahn B., Park D., Choi J., Ryu J., Yoon W. Dense Nanostructured Hydroxyapatite Coating on Titanium by Aerosol Deposition. *J. Am. Ceram. Soc.*, 92, 683-687, 2009.
- [58]. Ferreira A., Gentile P., Chiono V., Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.*, 8, 3191-3120, 2012.
- [59]. Bumgardner J., Wiser R., Gerard P., Bergin P., Chestnutt B., Marini M., Ramsey V., Elder S., Gilbert J. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial / dental implants. *J. Biomater. Sci-Polym.*, 14, 423-438, 2003.
- [60]. Ruan Q., Zhu Y., Li F., Xiao J., Zeng Y., Xu F. Investigation of layer-by-layer assembled heparin and chitosan multilayer films via electrochemical spectroscopy. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 333, 725-733, 2009.
- [61]. Kaiyong C., Yan H., Klaus D.J., Yuanliang W. Surface modification of titanium thin film with chitosan via electrostatic self-assembly technique and its influence on osteoblast growth behavior. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 19, 499-506, 2008.
- [62]. Poh C., Koon N., En K., Wilson W. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers

- and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials*, 29, 1412-1421, 2008.
- [63]. Thierry B., Winnik F., Merhi Y., Silver J., Tabrizian M. Bioactive Coatings of Endovascular Stents Based on Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules*, 4, 1564-1571, 2003.
- [64]. Meng S., Liu Z., Shen L., Guo Z., Chou L., Zhong W., Du Q., Ge J. The effect of a layer-by-layer chitosan-heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials*, 30, 2276-2283, 2009.
- [65]. Shin J., Eun L., Se Y., Hyoun K., Hae K., Young H. A bioactive coating of a silica xerogel/chitosan hybrid on titanium by a room temperature sol-gel process. *Acta Biomater.*, 6, 302-307, 2010.
- [66]. In K., Seog S., Hyun M., Mi Y., In P., Bom K., Chong C. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.*, 26, 1-21, 2008.
- [67]. Martin H., Schulz K., Bumgardner J., Schneider J. Enhanced bonding of chitosan to implant quality titanium via four treatment combinations. *Thin. Solid. Films.*, 516, 6277-6286, 2008.
- [68]. Shi Z., Neoh K., Kang E., Poh C., Wilson W. Surface functionalization of titanium with carboxymethyl chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2 for enhanced osseointegration. *Biomacromolecules*, 10, 1603-1611, 2009.
- [69]. Lu S. Immobilization of antimicrobial peptides onto titanium surfaces. Tesis de Maestría, Ciencias de los Materiales e Ingeniería, Universidad De British Columbia, 2009.
- [70]. Xu X., Wang L., Guo S., Lei L., Tang T. Surface Chemical Study on the Covalent Attachment of Hydroxypropyltrimethyl Ammonium Chloride Chitosan to Titanium Surfaces. *Appl. Surf. Sci.*, 257, 10520-10528, 2010.
- [71]. Shin J., Kim K., Kim S., Koo K., Kim T., Seol Y., Ku Y., Rhyu C., Chung C., Lee Y. Ex vivo bone morphogenetic protein-2 gene delivery using gingival fibroblasts promotes bone regeneration in rats. *J. Clin. Periodontol.*, 37, 305-311, 2010.
- [72]. Zujur D., Moret J., Rodriguez D., Cruz L., Lira J., Gil L., Dominguez E., Alvarez-Barreto J. A. Novel photocrosslinkable and cytocompatible chitosan coating for Ti6Al4V surfaces. *J Appl Biomater Funct Mater.*, 2015. *Ahead of Print*