

Desarrollo y Evaluación In Vivo de un Biomaterial a base de Sulfato de Calcio para Regeneración Osea.

Mariano A. López

Carrera de Magister en Implantología Oral. Fac. de Odontología. UNLP
marianolopez_bbhotmail.com

Director: Prof. Dra. Alicia Kitrilakis Codirector: Prof. Med. Vet. Cecilia Carbone

Resumen

Los biomateriales para regeneración ósea son cada vez más utilizados. Los de origen sintético son a menudo mejor aceptados por los pacientes. Entre ellos, el sulfato de calcio ha sido ampliamente usado. **Objetivos:** Desarrollar y evaluar un biomaterial para regeneración ósea a base de sulfato de calcio enriquecido con minerales. **Material y Métodos:** Se utilizó sulfato de calcio de grado médico y minerales (Carbonato de Ca 60 %, Fosfato de K 35 %, Fluoruro de Na 2,5 % y Gluconato de Mg 2,5 %), preparados en un laboratorio bioquímico. Los mismos fueron mezclados en proporción 50 y 50, se adicionó agua estéril y se mezcló para iniciar el fraguado. Luego el material se molió generando micropartículas, que fueron envasadas y esterilizadas en autoclave. Posteriormente fue injertado en defectos óseos de 3 x 3 x 9 mm del fémur de 20 ratas Wistar, SPF, DE 16 semanas de edad y 500 gr de peso. Se tomaron muestras a los 30 (T1) y 60 días (T2) las cuales fueron evaluadas histológicamente. **Resultados:** El material logrado presenta una consistencia blanda, fácil de manipular, buena porosidad con gran capacidad de embeberse en sangre y mostró buena tolerancia. Histológicamente se observa la regeneración completa de los defectos, con formación de trabéculas de grosores variables e interconectividad entre las mismas, las cuales presentan mayor densidad a T2 con respecto a T1.

Conclusiones: Dentro de los límites de este estudio el material desarrollado es bien tolerado y posibilita la regeneración ósea de un defecto crítico. Evaluaciones a mayores plazos, así como pruebas clínicas, son necesarias para una mejor comprensión de su posible utilización como sustituto óseo.

Palabras claves: Injertos de hueso – Regeneración Ósea - Sustitutos sintéticos

Desarrollo y Evaluación In Vivo de un Biomaterial a base de Sulfato de Calcio para Regeneración Osea.

INTRODUCCIÓN:

Regenerar el hueso perdido ha sido desde tiempo atrás objeto de muchos estudios. En el campo de la odontología, a partir del desarrollo de la implantología es que comenzaron a realizarse cada vez más estudios con respecto a este tema, debido a la falta, en muchas ocasiones, de hueso disponible para colocar implantes.

Por esto, en los últimos tiempos, las investigaciones han estado centradas en crear nuevo hueso donde sea necesario, y así poder aumentar el número de personas que puedan recibir implantes.

Con este fin se han utilizado diversos materiales y técnicas. Dentro de ellos están las membranas, que actúan como una barrera para mantener el volumen de los defectos del hueso, aislándolo a su vez del tejido conjuntivo.

No obstante, cuando el defecto óseo a tratar es muy grande, o bien no es favorable, es necesario realizar injertos de hueso para ganar el volumen perdido. El uso de hueso del mismo paciente ha sido probado, y es elegido como primera opción para estos procedimientos, aunque conlleva una cirugía adicional para tomar el hueso a injertar, usualmente de la zona del mentón, trígono retromolar, tuberosidad del maxilar o, menos frecuentemente, de calota craneana o cresta

ilíaca, dependiendo de la cantidad necesaria. Muchas veces para los pacientes esta cirugía adicional es muy traumática. Para evitar este problema, se han propuesto aloinjertos (hueso humano procesado en diferentes formas), xenoinjertos (por ej. hueso bovino), o material aloplásticos a base fosfato de calcio.

En trabajos previos de nuestro grupo se evaluó un sustituto óseo sintético a base de sulfato de calcio, con resultados preliminares alentadores, aunque con una velocidad de reabsorción relativamente lenta. Esto último podría solucionarse generando partículas de menor tamaño y mayor porosidad.

Por otra parte, el hueso presenta una gran cantidad de minerales, que podrían combinarse dentro de un sustituto sintético para mejorar la mineralización del hueso neoformado, aunque esto no ha sido evaluado aún.

OBJETIVOS:

Identificar factores que favorezcan la neoformación ósea.

Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento del Sulfato de Calcio en partículas como biomaterial osteoconductor

Estudiar, analizar y evaluar el comportamiento del sulfato de calcio en partículas enriquecido con minerales como biomaterial osteoconductor

Diseñar una estrategia terapéutica frente a los defectos estructurales del hueso.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se utilizaron 30 ratas macho, de cepa Fisher 344 (F344/N), originarias del Instituto Nacional de Salud de los EE.UU., y producidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, endocriadas, libres de patógenos específicos (SPF), de 16 semanas de edad y de 500 gramos de peso.

Los animales fueron divididos en tres grupos de 10 cada uno, manteniéndose durante 48 horas en condiciones ambientales convencionales: Temperatura 23 +/- 1 grados centígrados, humedad 50/55 %, iluminación 12 hs luz/ 12 hs oscuridad, con alimento balanceado comercial y agua autoclavada ad-libitum.

Dos horas antes de la intervención quirúrgica se les retiró el alimento, manteniéndolas con dieta líquida.

Todas fueron operadas bajo anestesia general con ketamina/xilacina 75 mg/kg + 10 mg/kg por vía IM.

Se depiló la piel en la zona del fémur, luego se realizó una incisión en piel con bisturí y se continuó en el plano muscular con tijeras por divulsión, hasta identificar el hueso.

Una vez limpio y retirado el periostio, se realizaron tres perforaciones de 9 mm de largo, por 3 mm de ancho y 3 mm de profundidad, mediante fresas montadas en un motor eléctrico de cirugía, que fueron injertados con los sustitutos óseos a evaluar, siendo los animales divididos en grupos de 10 cada uno, según las variables independientes más un grupo control – Grupo 1: sulfato de calcio, grupo 2: sulfato de calcio con minerales, grupo 3: control, sin tratamiento.

Una vez finalizado, se realizó una sutura por planos.

El Sulfato de Calcio en partículas se realizó mediante el fraguado del mismo en polvo al combinarlo con solución fisiológica estéril, y se generó posteriormente las partículas por

fragmentación. El enriquecimiento con minerales se efectuó combinando un 50% de polvo de sulfato de calcio y un 50% de minerales en polvo y luego produciendo el fraguado como en el caso anterior. El polvo de minerales esta compuesto por un 50% de calcio; 35% de fósforo; 10% de carbonato; 1,5 % de magnesio; 1,5% de fluor; 1% de potasio; y 1% de sodio.

Durante el postoperatorio, los animales permanecieron alojados bajo observación en el pabellón de Animales de Experimentación de la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

A los 30 (T1) y 60 (T2) días los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono, y los fémures resecados mediante discos de corte de carburo. Se obtuvieron fotografías directas y se realizó una evaluación macroscópica mediante lupa estereoscópica. Luego las muestras fueron fijadas en formol al 10% a 4⁰C, descalcificadas en EDTA, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo, montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina eosina, para su posterior observación a través de un microscopio óptico.

Se seleccionaron preparados (T1 y T2) para realizar una evaluación inicial, los cuales fueron capturados mediante una cámara de video (Sony DXC-151A) montada sobre un microscopio óptico (Olympus SZ 40) y posteriormente digitalizados mediante una placa digitalizadora (Flashpoint 128, Integral Technologies, USA).

En la próxima etapa se completará la recolección de muestras y serán evaluadas con un analizador digital de imágenes (ImagePro Plus v4.1. - Media Cybernetics, USA) para calcular el grado de regeneración obtenido. Los distintos elementos de la imagen histológica serán segmentados en base al color de la tinción, y posteriormente calculada su superficie. Estos estudios se llevarán a cabo en el Servicio de Microscopía de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

RESULTADOS:

El material logrado de Sulfato de Calcio solo y enriquecido con materiales presentó una consistencia blanda, fácil de manipular, buena porosidad con gran capacidad de embeberse en sangre y mostró buena tolerancia.

La producción del mismo es relativamente sencilla y económica. Se observó que en el caso del enriquecido con minerales, la estructura resultó en una aparente mayor porosidad, con respecto al sulfato de calcio solo.

Asimismo, la incorporación de dichos minerales aceleró la reacción de fraguado del material.

Macroscópicamente en el grupo 2, se pudo determinar la formación completa del defecto óseo, notándose la presencia de partículas del injerto en el mismo. En el grupo 1, se observó una formación incompleta, en grados variables, y escasos restos del injerto, aparentemente por una reabsorción muy veloz. En el grupo 3, no se produjo regeneración, quedando una amplia cavidad residual.

Microscópicamente, en la evaluación inicial de ambos grupos experimentales, no se observan reacciones inflamatorias importantes, ni signos de encapsulamiento fibroso del material, lo cual lo sitúa como biocompatible. Asimismo, en el grupo 2, aunque no ha sido evaluado en detalle aún, se observa un aparente trabeculado de neoformación rodeando las partículas del injerto, las cuales presentan mayor densidad a T2 con respecto a T1.

DISCUSION:

El sulfato de calcio tiene una larga, y controvertida, historia de uso en medicina y odontología. Muchos investigadores, como Puleo DA y Al-Sabbagh M. han demostrado que el Sulfato de Calcio es un material biocompatible y que es reabsorbido totalmente después de la

implantación pero no crea un entorno rico de calcio, aunque se pudo demostrar que estos iones de calcio pueden proporcionar un cierto estímulo a los osteoblastos. Melo LG, Nagata MJ, Bosco AF, Ribeiro LL, y Leite CM mediante un estudio histológico e histométrico en tibias de la rata, demostraron que el uso de Sulfato de calcio como barrera en defectos quirúrgicos injertados con cristales bioactivos tenían considerablemente más formación de hueso que el grupo que utilizó el cristal bioactivo solamente, 30 y 60 días después de las cirugías, afirmando así que el Sulfato de Calcio se puede utilizar como osteoconductor en la regeneración ósea.

Mediante la incorporación de minerales óseos al Sulfato de Calcio, se mejorarían las propiedades del hueso cicatrizal haciéndolo más denso y aceleraríamos la remineralización ósea por la sola presencia del mineral.

Todo material de sustitución ósea tiene un objetivo fundamental, que es actuar como matriz para el crecimiento del hueso, y luego de esto ser reabsorbido hasta ser reemplazado totalmente por tejido óseo vivo. Una matriz ideal debería ser lo más porosa posible, para favorecer la revascularización, pero a la vez no tanto para que no se reabsorba antes de cumplir su cometido.

En este sentido, nuestras apreciaciones iniciales muestran como el sulfato de calcio solo se ha reabsorbido antes del tiempo necesario. Mientras tanto, en el combinado con minerales la reabsorción fue más lenta, siendo interesante destacar, como mencionamos al principio, que esta combinación poseía una mayor porosidad, al menos hasta el nivel de detalle evaluado al momento.

Por último, cabe agregar que la materia prima de la cual se hace el sulfato de calcio es relativamente barata y abundante. En el caso de que estas observaciones preliminares sean confirmadas por los estudios histológicos, podríamos disponer de un nuevo biomaterial, mucho más económico que los disponibles actualmente.

CONCLUSIONES:

Dentro de los límites de este estudio, podemos concluir que el material desarrollado es bien tolerado y posibilita la regeneración completa de un defecto crítico cuando fue tratado con Sulfato de Calcio enriquecido con minerales. El estudio mediante microscopía óptica, es necesario para una mejor comprensión de su posible utilización como sustituto óseo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Fernandez E, Vlad MD, Gel MM et al.** *Modulation of porosity in apatitic cements by the use of alpha-tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures.* Biomaterials. 2005 Jun;26(17):3395-404.
2. **Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC.** Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002 Jan-Feb;17(1):86-94
3. **Lorenzoni, M; Pertl, C; Keil, C et al.** "Treatment of peri-implant defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study with various membranes and bone grafts". *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(5):639-46
4. **Luchetti, C.** " *Injertos Autólogos, Alógenos, Xenógenos y Sintéticos en el Tratamiento de Grandes Defectos Estructurales del Hueso* " *Revista Argentina de Osteología*, 2005, 4 (1): 9 – 23
5. **Luchetti, C; Ayala, M.** " *Eficacia del Pamidronato Disódico en Regeneración Ósea Guiada* " *Revista del Circulo Odontológico de Rosario*, 2003, 67 (1): 11-16
6. **Manjubala I et al.** " *Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition.* " *J Biomed Mater Res.* 2002;63(2):200-8.
7. **Marks Jr, SC; Hermey, DC.** " *The Structure and Development of Bone* " En: Bilezikian, JP; Raiz, LG; Rodan, GA. " *Principles of Bone Biology* " 1996, Academic Press, pages. 3-14

8. **Moore WR, Graves SE, Bain GI.** "Synthetic bone graft substitutes". ANZ J Surg. 2001 Jun;71(6):354-61
9. **Murashima Y, Yoshikawa G, Wadachi R, Sawada N, Suda H.** Calcium sulphate as a bone substitute for various osseous defects in conjunction with apicectomy. Int Endod J 2002 Sep;35(9):768-74
10. **Nidoli MC; Nielsen FF; Melsen B** "Endochondral vs. intramembranous demineralized bone matrices as implants for osseous defects". J Craniofac Surg 1999 May;10(3):177-85
11. **Nilsson M, Wang JS, Wielanek L et al.** *Biodegradation and biocompatibility of a calcium sulphate-hydroxyapatite bonesubstitute.* J Bone Joint Surg Br. 2004 Jan;86(1):120-5.
12. **Phang MY, Ng MH, Tan KK et al.** *Evaluation of suitable biodegradable scaffolds for engineered bone tissue.* Med J Malaysia. 2004 May;59 Suppl B:198-9.
13. **Rabie AB; Chay SH** Clinical applications of composite intramembranous bone grafts Am J Orthod Dentofacial Orthop 2000 Apr;117(4):375-83
14. **Rabie AB; Chay SH; Wong AM** "Healing of autogenous intramembranous bone in the presence and absence of homologous demineralized intramembranous bone". Am J Orthod Dentofacial Orthop 2000 Mar;117(3):288-97
15. **Rabie AB; Wong RW; Hagg U** "Composite autogenous bone and demineralized bone matrices used to repair defects in the parietal bone of rabbits." Br J Oral Maxillofac Surg 2000 Oct;38(5):565-570