

Caracterización estructural y biointegración del sustituto óseo BioOsteo®

C. Mendoza-Barrera^{a,1}, M. Meléndez-Lira^{b,1}, E. García-López^{c,2} y C. Hernández-Flores^{d,3}

¹Departamento de Física, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.,
Apartado Postal 14-740, 07000, Tel/fax +(55) 50 61 38 28, México, D.F., México.

²Departamento de Biología Molecular, Carpermor: Laboratorio de Referencia Internacional,
C.P. 06470, México D.F., México.

³Laboratorio de Bioquímica, Centro Nacional de Rehabilitación,
14389 México, D.F., México.

e-mail: ^aclaudia@fis.cinvestav.mx,

^bmlira@fis.cinvestav.mx,

^ceduardog32@lettera.com,

^dchernadez@cnr.gob.mx.

Recibido el 26 de septiembre de 2002; aceptado el 2 de julio de 2003

El objetivo de este trabajo es la caracterización y evaluación de la biointegración del sustituto óseo BioOsteo® (Hig-Med) en un modelo de tibia de rata. Ningún rechazo o reacción inflamatoria se presentó durante un periodo de 8 semanas en nuestros estudios *in vivo*. La caracterización del material y su evolución en la osteointegración se monitoreó empleando microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia por energía dispersiva (EDS) y difracción por rayos X (XRD). Concluimos que el sustituto óseo BioOsteo® es un biomaterial a base de calcita que no actúa por osteoconducción sino por desplazamiento y se propone su empleo en reparaciones óseas de huesos anchos.

Descriptor: Sustituto óseo; osteointegración; mineralización.

The aim of this work is the characterization and evaluation of the biointegration of BioOsteo® (Hig-Med) bony graft on a rat tibia model. No implant rejection or inflammatory reaction was observed during an 8 weeks period in our *in vivo* studies. The evolution of the osteointegration was followed employing scanning electronic microscopy (SEM), energy dispersive X-rays Spectroscopy (EDS) and X-ray diffraction (XRD). We concluded that BioOsteo® based graft is a calcite-based biomaterial that works by a displacement mechanism and we suggested its use like bony graft for width bones.

Keywords: Bone substitute; osteointegration; mineralization.

PACS: 87.17; 87.64Bx; 87.64Ee; 87.80Pb

1. Introducción

En algunas enfermedades que alteran la estructura ósea como fracturas, osteítis (sifilítica, parasitarias o tóxicas) u osteosarcomas es necesaria, en ocasiones, aparte de terapia física y medicación, la cirugía. Es en estos casos cuando los injertos autólogos, alógrafos o sintéticos (biomateriales) se emplean como matriz intratrabecular para auxiliar en la reparación y disminución del tiempo de consolidación ósea. La reparación ósea se caracteriza por tres fases; una fase inflamatoria (1–3 semanas), una fase media (4–5 semanas) y una fase reparativa en la cual los llamados factores de crecimiento regresan a su estado basal. A nivel celular la respuesta del hueso a un trauma consiste de una serie de eventos interrelacionados entre sí de manera específica. Básicamente éstos son la angiogénesis, migración, proliferación de células indiferenciadas, diferenciación en osteoblastos, producción de osteoides, mineralización y remodelación [1–3].

En las últimas décadas se han desarrollado y empleado materiales como Hidroxiapatita (HA), compuestos de coral-colágena, coral natural, cerámicos a base de carbonato de calcio y combinaciones de colágena en una amplia variedad de tratamientos terapéuticos [4–10]. Las funciones de estos materiales dentro del hueso son básicamente dos: 1) servir como estructura o matriz para las células indiferenciadas, y 2) in-

crementar el potencial osteogénico de diversos factores de crecimiento, los cuales a su vez inducen la proliferación de células indiferenciadas y su diferenciación en células osteoblásticas [11].

El objetivo de nuestro estudio es la caracterización y evaluación de un sustituto óseo en un modelo de tibia de rata como una alternativa de injerto sintético.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Como material de implante se propuso al sustituto óseo BioOsteo® (Hig-Med), que es un biopolímero osteointegrable que tiene un peso específico y elasticidad similares a las del hueso. Se emplearon ratas Wistar machos sanos de 300–370 g. a los cuales, antes y después de realizados los implantes, se aislaron y colocaron en grupos de 5 individuos por caja. Alimento y agua fueron administrados *ad libitum*.

Para los experimentos se dividieron a los individuos en cuatro grupos de ocho y cinco miembros. Los grupos de 8 individuos se destinaron a estudios SEM y EDS, mientras que los grupos de 5 individuos a estudios de XRD. Se rotularon como: grupo C (control) y grupo B (injerto). Se les

ocasionó una lesión de 1mm de diámetro en la superficie anteromedial central de la tibia derecha, donde, dependiendo del grupo, se suturó sin implante (grupo C) o se injertó el material (grupo B). En estudios previos, se considera una fractura a una lesión que abarque dos terceras partes del diámetro del hueso a lesionar y 8 semanas como tiempo adecuado para un proceso de reparación espontánea. Las tibias izquierdas se utilizaron como controles contralaterales. Un espécimen por grupo fue sacrificado a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas después de colocado el implante y la región de interés fue procesada para realizar estudios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis químico. Se sacrificaron los individuos de los segundos grupos a la tercera semana del tratamiento y fueron estudiados mediante XRD. Los cortes analizados y evaluados fueron de tipo transversal en la región interfacial entre el implante y hueso cortical.

2.2. Difracción por rayos X

La estructura del material se determinó empleando un difractómetro de rayos X (Siemens D5000) con un blanco de Cu ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$).

2.3. Microscopía electrónica de barrido y microanálisis por energía dispersiva de rayos X

Las muestras fueron fijadas en solución amortiguada de glutaraldehído a un pH de 7.4, éstas fueron cortadas alrededor de la lesión y vueltas a fijar en una solución de tetroxido de osmio. Se deshidrataron empleando diferentes concentraciones de etanol, pasando por tres fases de deshidratación en etanol absoluto y un secado a punto crítico (Sandri-780A). Finalmente fueron montadas y recubiertas con una capa de oro (Desk II) para su observación. Las observaciones de la sección transversal de interés fueron realizadas con un microscopio electrónico de barrido (JSM 6300 JEOL) a 15 kV y diferentes amplificaciones, mientras que el microanálisis se realizó con un sistema NORAN 1100/1110EDX.

3. Resultados y discusión

La Fig. 1 muestra los patrones de difracción de rayos X para muestras de hueso cortical de tibia de rata y del sustituto óseo BioOsteo[®] (al cual nos referiremos como *el sustituto óseo*). El CaCO_3 es uno de los biominerales que con más frecuencia se encuentran en tejidos duros en diversas especies [12]. Por otro lado, múltiples estudios muestran la potencialidad osteogénica del CaCO_3 en sus diversas formas [13,14]. Dado que el sustituto óseo en su mayoría es CaCO_3 , esperamos que la presencia del material promueva la migración de células indiferenciadas y osteoblastos en la lesión y por tanto que la reabsorción sea rápida. El BioOsteo[®] es un biomaterial formado por una parte polimérica y una cristalina (Fig. 1). La estructura cristalina del BioOsteo[®] corresponde a CaCO_3 en forma de calcita (hexagonal), con parámetros de red $a = 4.969 \text{ \AA}$ y $c = 16.903 \text{ \AA}$, y distancia interplanar

$d = 3.015 \text{ \AA}$. Se encontró a partir del patrón de difracción de rayos X del hueso cortical de tibia de rata, empleando la ecuación de Scherer, que la biohidroxiapatita (HA) contenida en las muestras tiene un tamaño de grano alrededor de 125 \AA , lo cual concuerda bastante bien con lo reportado en la literatura [15]. Por otro lado, el patrón de difracción correspondiente a la muestra de hueso de tibia de rata presenta picos muy anchos que se deben a que el hueso es un compuesto constituido de 60 a 70 % de cristales minerales inorgánicos y de 30 a 40 % de una matriz orgánica, en su mayoría, a base de fibras proteínicas de colágena y células óseas. Dependiendo del segmento, el hueso difiere en la proporción, tamaño y arreglo de fibras, cristales y cemento en la matriz; y en el tamaño, forma y patrón de los osteocitos. La mayor parte mineral constituyente del hueso es muy cercana a la hidroxiapatita (HA) $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ y al trifosfato de calcio (TCP) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, con pequeñas cantidades de otros iones como Mg^{2+} , Fe^{2+} (en sangre), F^- y Cl^- . Dado el intercambio celular también podemos encontrar presentes trazas de Na^+ , K^+ , ácido ascórbico, ácido cítrico, polisacáridos y algunos átomos pesados como Ba^{2+} , Sr^{2+} y Pb^{2+} [16-20]. De hecho, nuestros resultados de EDS para hueso cortical en cortes transversal, longitudinal y tangencial corroboran que los elementos con números atómicos mayores a Na^{11} que se encuentran presentes en hueso son calcio y fósforo con trazas de Mg, Fe, F, Cl, K, Ba, Sr y Pb. Las razones Ca/P para diáfnisis de rata de 300-370 g varían de 1.86 a 1.88 ($p > 0.05$). Ver Tabla I. Se encontró que el material propuesto como injerto está constituido mineralmente por 87.95 % de Ca, 9.33 % de P, 1.2 % de Na, 1.1 % de K y trazas de Mg ($< 1\%$).

Dado que el hueso es de naturaleza orgánica con grandes cantidades de calcio y el sustituto óseo es un material a base de carbonato de calcio, es de esperarse que los patrones de difracción de ambas muestras tengan algunos picos coincidentes.

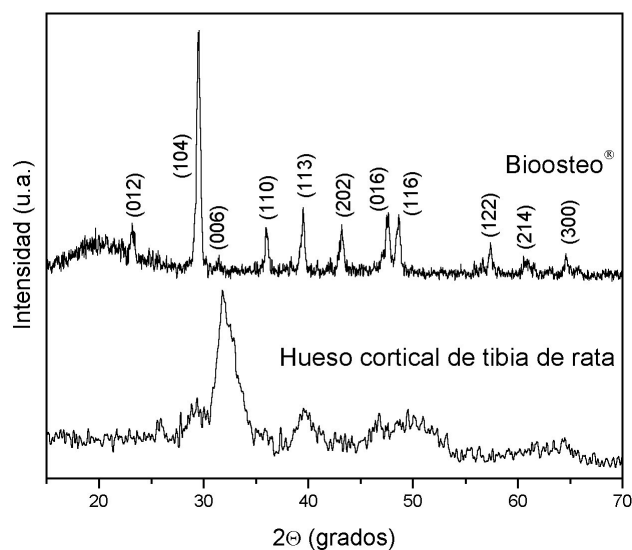


FIGURA 1. Espectros de difracción de rayos X del sustituto óseo y de hueso cortical de rata.

TABLA I. Razones Ca/P por EDS de muestra de hueso cortical y sustituto óseo implantado.

Muestra	Razón Ca/P (%)
Hueso (corte tangencial)	1.88
Hueso (longitudinal)	1.86
Hueso (transversal)	1.87
Substituto óseo BioOsteo®	9.42

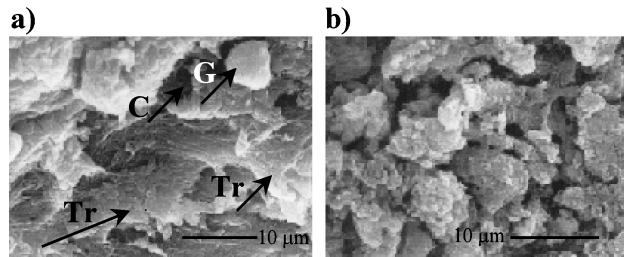


FIGURA 2. Micrográficas por SEM de, a) hueso de tibia de rata en corte transversal y b) material injertado X2500. Las flechas (Tr) muestran diferentes orientaciones de las trabéculas, la presencia de células globulares (G) (leucocitos) y cavidades (C). Barra = 10 μm.

Los análisis de EDS muestran que las razones de Ca/P para los dos tratamientos varían conforme la reparación de la lesión. La Tabla II muestra la evolución de la razón de las concentraciones de razón Ca/P para los ocho individuos de cada grupo en la región de la lesión.

Se observa que la razón Ca/P para el grupo control aumenta de 0.57 a 1.59 durante un periodo de 56 días, teniendo en cuenta que la razón Ca/P de un hueso completamente reparado oscila entre 1.86 y 1.88 se corrobora que la mineralización del proceso de reparación no ha concluido (ver Tabla I). La razón para el grupo tratado con el injerto también aumenta, de 9.13 a 9.41, lo que es de esperarse dado que el proceso de colocar un injerto óseo en una lesión equivale a un proceso de reparación espontánea de una fractura. Nótese que el aumento en la razón no es equiparable al grupo control,

TABLA II. Razones Ca/P para los dos grupos: Control (C) y bio-material (B).

Muestra	Ca/P (%)	Muestra	Ca/P (%)
C1	0.57	B1	9.13
C2	0.62	B2	9.17
C3	0.76	B3	9.21
C4	0.89	B4	9.26
C5	1.19	B5	9.31
C6	1.35	B6	9.35
C7	1.48	B7	9.38
C8	1.59	B8	9.41

es decir, mientras que para el grupo control hay un aumento de 1.02 en la razón Ca/P durante 56 días, en el grupo con injerto sólo hay un aumento en 0.28. El ligero aumento en la razón del grupo con injerto indica una reabsorción parcial del material y un proceso lento de mineralización del hueso.

En la corroboración de esta hipótesis se evaluaron muestras de ambos tratamientos a la tercera semana de realizada la lesión mediante XRD, encontrándose que el grupo C muestra los picos característicos de un hueso cortical pero no con la misma intensidad; mientras el grupo B muestra estos mismos picos con menor intensidad así como la presencia del pico más intenso del sustituto óseo (en 29.5°). Los picos por arriba y debajo de este se atenúan (Fig. 3). Por ello podemos aseverar que la reabsorción del material ha comenzado ya en esta semana.

En la Fig. 4 presentamos micrografías de la superficie anteromedial de la tibia en la interficie de la lesión para ambos tratamientos a las 2, 3 y 5 semanas del mismo. Las flechas muestran las fibras de colágena de diversa madurez, siendo las más gruesas para el grupo C a la 5ª semana. También se muestran la presencia de estructuras globulares (G), células de linaje osteoblástico (O) y presencia de material (M) para el grupo B, presentándose huellas de actividad osteoclástica sobre él (Figs. 4d, 4e y 4f); pero en general se presentó una mayor actividad celular en las muestras del tratamiento sin injerto.

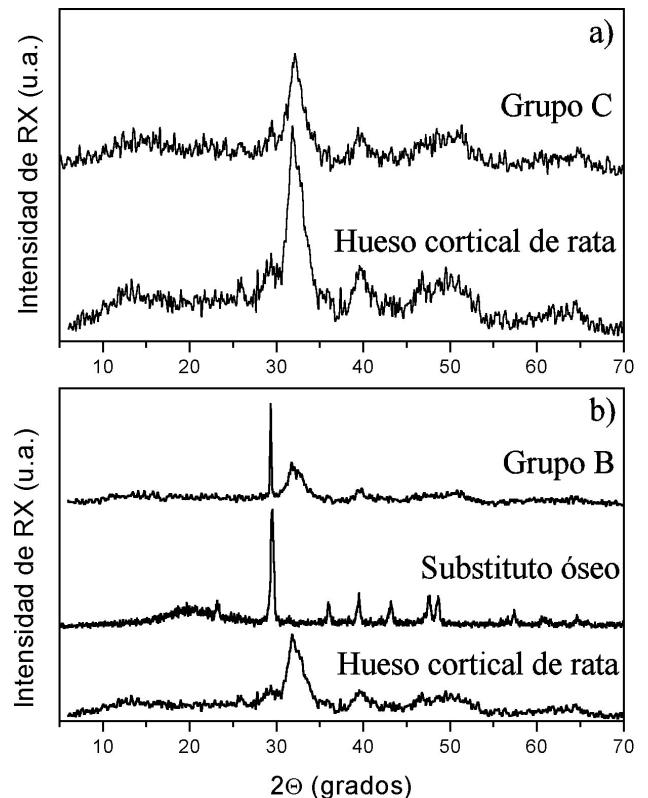


FIGURA 3. Difracción por rayos X de la superficie anteromedial de tibia de rata a la 3ª semana para a) grupo Control (C) y b) grupo Biomaterial (B).

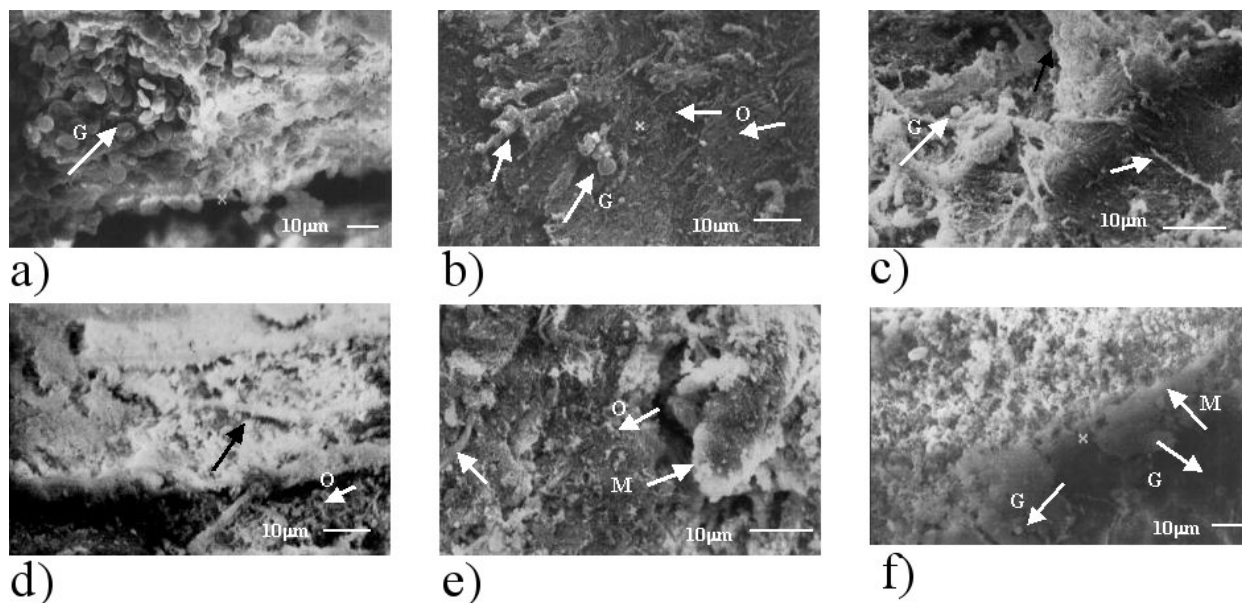


FIGURA 4. Micrografías de la superficie anteromedial de tibia de rata para grupos Control y Biomaterial. a) Grupo C 2^a semana, b) grupo C 3^a semana, c) grupo C 5^a semana, d) grupo B 2^a semana, e) grupo B 3^a semana, g) grupo B 5^a semana de colocado el implante, 15 kV, barra = 10 µm, X1000 (grupos a la 2^a semana), X2500 (grupos 5^a semana) y X3500 (grupos 3^a semana). Donde M = BioOsteo[®], y G = Células globulares (leucocitos).

Las células óseas encargadas del proceso de reparación-demolición de hueso son la dupla osteoblasto-osteoclasto. Los osteoblastos son las células formadoras de hueso, mientras que los osteoclastos son las células responsables de la reabsorción de la parte mineral de la matriz extracelular. La función de un injerto es insertar una matriz en la lesión o fractura que permita que las células indiferenciadas migren y proliferen. Se espera que los injertos sintéticos sean biocompatibles y osteoinductivos para que en el proceso normal de reparación sean reabsorbidos por el cuerpo, pero, dependiendo de la función del injerto será su selección. Un ejemplo son los casos de reparación de fractura en huesos largos donde la reabsorción debe ser completa para que la función mecánica de estos segmentos sea normal.

Un injerto (alógeno, autógeno o sustituto óseo) debe ser capaz de soportar esfuerzos, cuando es necesario. Esto requiere que su estructura se mantenga mientras el hueso es reparado. Los materiales osteoconductivos pueden actuar de dos maneras, la primera es que vasos y células osteoprogenitoras crezcan dentro de él [22]. En este caso, el injerto actúa como una malla. Alternativamente, un material puede exhibir sustitución, esto es, no habrá una introducción celular a su interior sino una reabsorción conforme el hueso se vaya formando. Se sabe que se realiza una penetración vascular y formación ósea menor y más lentamente cuando se trata de la incorporación de aloinjertos o sustitutos óseos que cuando se trata de autoimplantes [23]. La microestructura de los biomateriales empleados como sustitutos óseos (esto es, su volumen, densidad de poros e interconexiones, así como su superficie) actúan sobre la degradación y crecimiento de hueso nuevo dentro o por desplazamiento del material. Aparte de su composición química, su biodegradación es directamen-

te influenciada por el tamaño de poro. Un incremento en la porosidad puede favorecer el crecimiento dentro del material pero puede aminorar sus propiedades bioquímicas. En estudios *in vitro* el tamaño mínimo necesario es de 20 micras, pero el más favorable para la penetración celular es de 49 micras, mientras que *in vivo* un tamaño de poro de interconexión de 20 micras permite una penetración celular y una formación de tejido endocondrial dentro de los macroporos. Sin embargo un tamaño de interconexión arriba de 50 micras asegura la formación de hueso mineralizado [24].

Entonces, cuando un injerto, implantado en hueso, presenta un tamaño de poro de interconexión mayor a 50 micras se asegura la formación de hueso mineralizado y la acción de células progenitoras dentro de él; mientras que para interconexiones menores la formación de hueso es por sustitución del material [21,23]. Nuestros estudios de SEM muestran que la degradación del sustituto óseo fue por actividad celular, esto es, por la acción de células osteoclasticas, dado que el material presentaba erosiones, huellas en su superficie y disminución de tamaño de grano en algunas regiones. La mayoría de los sustitutos óseos o no son reabsorbidos o sólo parcialmente. Esta baja reabsorción no es necesariamente una desventaja, un ejemplo lo constituye la reconstrucción de barbilla dado que se necesita que el material de injerto quede como puente permanente. En nuestro caso, el grupo tratado con el sustituto presentó un mínimo incremento en la razón Ca/P, esto es, a la par de la mineralización de la reparación se llevó a cabo una reabsorción mínima del material. Ello nos permite proponer este sustituto óseo como material de injerto no de huesos largos sino de hueso anchos, como los faciales.

4. Conclusiones

Mediante estudios de XRD se encontró que la parte cristalina del sustituto BioOsteo® corresponde a calcita en forma hexagonal, misma que al ser evaluada en estudios *in vivo* presenta una variación de la razón Ca/P, en la región de la lesión, de 0.28 durante un periodo de 56 días, atenuación en varios de los picos de intensidad de XRD correspondientes al material y huellas de actividad osteoclástica sobre él. Por ello, podemos concluir que el uso del sustituto óseo BioOsteo® está asociado a una disminución en la rapidez de reparación cuando es aplicado en lesiones de huesos largos. Se confirma que el mecanismo de resorción de materiales a base de CaCO₃ es por actividad celular (osteoclastos) y no por di-

solución, y que en estructuras como ésta, el crecimiento de hueso es por substitución. Dada su relativa reabsorción y su mecanismo de degradación se propone para injertos de reparaciones faciales.

Agradecimientos

Ma. de Lourdes Rojas Morales (UME CINVESTAV-IPN), Ana B. Soto Guzmán (Departamento de Física CINVESTAV-IPN), Marcela Guerrero (Departamento de Física CINVESTAV-IPN) y Hugo Lecona Butròn (Bioterio CNR-SS), por la asistencia técnica. Este trabajo fue apoyado parcialmente por CONACYT-México.

1. T.A. Einhorn, *Clin Orthop* **355S** (1998) S7.
2. C.T. Brighto, *J Bone Joint Surg Am* **73**(1991) 832.
3. A. Iwaki, S. Jungushi, Y. Oda, T. Izumi, J.I. Shida, M. Tsuneyoshi, and Y. Sugioka, *J Bone Miner Res* **12** (1997) 96.
4. E.M. Leize, J. Hemmerle, J.C. Voegel, and M Leize, *J Mat Sci: Mat Med* **10** (1999) 47.
5. J. Kettunen, A. Mäkelä, H. Miettinen, T. Nevalainen, M. Heikkilä, P. Törmälä, and P. Rokkanen, *Biomed Mater Res* **42** (1998) 407.
6. S.A. Redey, S. Razzouk, C. Rey, D. Bernache-assollant, G. Leroy, M. Nardin, and G. Cournot, *J Biomed Mater Res* **45** (1999) 140.
7. P. Frayssinet, D. Mathon, A. Lerch, A. Autefage, P. Collard, and N. Rouquet, *J Biomed Mater Res* **50** (2000) 125.
8. G. Daculsi, R. Rohanizadeh, P. Weiss, and J.M. Bouler, *J Biomed Mater Res* **50** (2000) 1.
9. J.Ch. Fricain, F. Rouais, and B. Dupuy, *J Biom Mat Res (Appl Biomat)* **33** (1996) 23.
10. R.F. Service, *Science* **289** (2000) 1498.
11. C.R. Perry, *Clinical Orthopaedics and Related Research* **360** (1999) 71.
12. S. Weiner and D. Adaddi, *J Mater Chem* **7** (1997) 689.
13. R. Yukna, *J Periodontol* **65** (1994) 177.
14. J. Vuola, H. Goransson, T. Bohling, and S. Askoseljavaara, *Biomaterials* **17** (1996) 1761.
15. G.H. Bourne, *The Biochemistry and Physiology of Bone*, 2a Edición (Academic Press, N.Y., 1972).
16. M. Jarcho, C.H. Bolen, M.B. Thomas, J. Bobick, J.F. Kay, and R.H. Doremus, *J Mater Sci* **11** (1976) 2027.
17. H. Akoi, K. Kato, M. Ogiso, and T. Tabata, *J Dental Outlook* **49** (1977) 567.
18. M.A. Lopes, J.C. Knowles, J.D. Santos, *Biomaterials* **21** (2000) 1905.
19. I. Manjubala, R.V. Suresh Kumar, and TP Sastry, *Trends in biomaterials & artificial organs* **14** (2001) 27.
20. S. Ramesh, *Malaysian Journal of Chemistry* **3** (2001) 35.
21. S. Goodman, *Acta Orthop Scand suppl* **258** (1994) 1.
22. M.R. Urist, A. Lietze, H. Mizutani, K. Takagi, J.T. Triffitt, J. Amstutz, R. Delange, J.D. Termine, G.A.M. Fineman, *Clin Orthop Rel Res* **162** (1981) 219.
23. P. Aspenberg, K.G. Thorngren, and L.S. Lohmander, *Acta Orthop Scand* **62** (1991) 481.
24. J.X. Lu, B. Flautre, K. Anselme, P. Hardouin, A. Gallur, M. Descamps, and B. Thierry, *J Mat Sci: Mat Med* **10** (1999) 111.