

LA BIOINTEGRACIÓN DE LOS FOSFATOS DE CALCIO, UN PROBLEMA DE INTERFAZ

Carlos H. Valencia^{1*}, *Mario A Ortiz*², *Sandra Arce*³

1: Implantólogo Oral y Reconstructivo. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali, Colombia

2: MSc. Facultad de Salud. Universidad Del Valle. Cali, Colombia

3: MSc. Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de Occidente. Cali, Colombia

*Contacto: carvalenc@gmail.com

RESUMEN

Los fosfatos de calcio tienen un gran potencial como substitutos óseos en técnicas regenerativas debido a su bioactividad y tasa de resorción relativamente rápida, pero se hace necesario conocer más acerca de la histodinámica de su biointegración.

En este trabajo se hace una aproximación al problema utilizando métodos de Histoquímica e Inmunohistoquímica. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle; y el objetivo consistió en estudiar el proceso de biointegración de un biocompuesto, (Fosfato tricalcico - quitosano), implantado en hueso parietal de ratas wistar.

Las muestras fueron recuperadas después de 20, 40, y 60 días, se realizaron tinciones con Hematoxilina–Eosina, Masson, y Gomori; además se utilizaron anticuerpos de actina de músculo liso, y anti-fosfatasa ácida tartrato resistente, (TRAP).

Se observó una reacción inflamatoria inicial que fue cediendo con el tiempo, simultáneamente hubo angiogénesis, colagenogénesis, osteoclastogénesis y osteoblastogénesis. La zona de material se incorporó al tejido circundante por una red de colágeno y vasos sanguíneos; se observaron células TRAP positivas, también se encontró material osteoide, y mineralización del mismo.

En la biointegración del material se formaron dos interfaces, en la primera se presentaron una serie de eventos moleculares que llevaron a la angiogénesis y colagenogénesis, lo que va a permitir la posterior invasión del material por células inflamatorias y de reparación.

En una segunda interfaz aparecen células gigantes multinucleadas TRAP positivas que se encargaran de fagocitar el biomaterial; y simultáneamente hay osteoblastogénesis con depósito y mineralización de matriz ósea extracelular.

Palabras Clave: *Fosfato tricalcico, Quitosano, Regeneración ósea, Biomateriales*

ABSTRACT

Calcium phosphate has a great potential as bone substitute in regenerative techniques due to its bioactivity and fast resorption rate. However, it is necessary to understand its biological integration dynamics.

This paper evaluates this problem using histochemistry and immunohistochemistry techniques. All protocols used in this work were approved by Animal Ethics Committee at Universidad del Valle. Therefore, the aim of this study was evaluate the biointegration process of a selected Calcium phosphate/chitosan bio-compound implanted in critical-size defects made by surgical techniques in parietal bone of male Wistar rats.

Samples were collected at 20, 40 and 60 days after implantation and were studied using histochemical (hematoxilin-eosin, Masson trichrome staining and Gomori Stain for reticulin) and immunohistochemistry techniques (using primary antibodies against human smooth muscle actin and tartrate-resistant acid phosphatase).

The histological evaluation of the samples shows a strong inflammatory reaction at initial stages that decreases in final stages. At the same time, angiogenesis, collagen synthesis, osteoclastogenesis y osteoblastogenesis may be described. The implanted bio-compound is incorporated in the surrounding tissue by a collagen and blood vessels network. TRAP positive cells (osteoclast-like cells) can be found around the biocompound.

Keywords: *Tricalcium phosphate, Chitosan, Bone regeneration, Biomaterials*

1 INTRODUCCIÓN

Los cementos de Fosfato de calcio han sido utilizados durante varios años como substitutos en técnicas de regeneración ósea, debido a sus cualidades de material biocompatible y osteoconductor [1,2]; sin embargo existe poca información acerca del proceso mediante el cual, el material es biointegrado, resorbido, y remplazado por tejido óseo en defectos de tamaño crítico.

Cuando se injerta un substituto óseo se forman dos interfaces: Una entre el material y el hueso periférico; y otra segunda que se establece entre las partículas del compuesto y su entorno biológico. El entorno biológico de las dos interfaces inicialmente es el mismo, pero luego se darán cambios cualitativos que las harán diferenciarse, debido a la misma dinámica cicatrizal. En el momento previo a la implantación del material, la cavidad está llena de sangre; al introducir el biocompuesto se va a formar un coágulo y se establecerá una red de fibrina, la cual actuará como matriz provisional para el proceso cicatrizal. En este momento se establece la primera interfaz entre el material implantado y el hueso periférico.

Al quedar embebido el biocompuesto en el coágulo, se inicia el establecimiento de la segunda interfaz, siempre y cuando el compuesto implantado tenga unas condiciones de superficie (rugosidad), y una porosidad adecuada en cuanto a tamaño de poro e interconectividad.

En el establecimiento de las dos interfaces juegan un papel importante las características del material, la superficie externa actúa como un conjunto; y las múltiples superficies internas serán determinantes en la relación entre las células y las moléculas del biocompuesto. En nanosegundos las biomoléculas de agua alcanzan las superficies del biomaterial, posteriormente se incorporan iones como Na⁺ y Cl⁻, la bicapa de agua y de iones permitirá que las proteínas plasmáticas se adsorban sobre la superficie de cada partícula en un distribución determinada por el efecto

Vroman, posibilitando finalmente la unión con las células [3]. En unos pocos minutos, los mecanismos de control de hemorragia y cicatrización producirán constricción de los vasos de la periferia, y se formará un tapón de plaquetas y fibrinógeno; cesando el suministro de oxígeno a las células sanguíneas que han quedado atrapadas en el coágulo.

La anoxia lleva a muerte celular lo cual va a activar el mecanismo de cicatrización mediante la liberación de citoquinas que estimularán la invasión de las interfaces por parte de células inflamatorias. Alrededor del tercer día las células inflamatorias inician el proceso de eliminación de detritos, la demanda de oxígeno excede el suministro en el interior del coágulo, el metabolismo anaeróbico lleva a un incremento en la concentración de lactato y a una disminución en el pH. [4].

La hipoxia incita a la señal quimiotáctica para que las células endoteliales y mesenquimales realicen la restitución de la red vascular, mediante liberación de VEGF, FGF, y FGFDP [4, 5]. La angiogénesis se inicia desde los vasos de la periferia, y simultáneamente los fibroblastos secretarán fibras colágeno para proveer el mecanismo de soporte para la red vascular y el proceso de osteogénesis, estableciéndose la matriz provisional que servirá de soporte a la cicatrización. En cuestión de días la interfaz externa va a resolverse mediante su incorporación al proceso de regeneración ósea, la red de colágeno reticular será el soporte para el crecimiento vascular y celular hacia el interior del biomaterial.

La segunda interfaz va a permanecer hasta que la totalidad del material sea degradado. Lo cual se da mediante una resorción mediada por células [2, 6]. En la fase aguda del proceso inflamatorio, hay proliferación de linfocitos, monocitos y macrófagos [5, 6]. Los linfocitos secretan IL 4, la cual activará la agregación de monocitos y la formación de unas células gigantes multinucleadas TRAP positivas, (similares a osteoclastos), que son las encargadas de disolver el fosfato y fagocitarlo [7]. El proceso inflamatorio, y la degradación del fosfato a su vez estimulan la regeneración ósea mediante la organización de la matriz extracelular, así como su posterior mineralización y maduración [8, 9, 10].

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron preparaciones bilaterales de 5 milímetros de diámetro, en huesos parietales de 15 Ratas wistar. Se organizaron tres grupos que fueron injertados con el biomaterial por períodos de 20, 40 y 60 días. Las preparaciones de los lados derechos fueron injertadas, y las del lado izquierdo se dejaron sin injertar, (control de defecto vacío).

La biocerámica fue obtenida en el laboratorio de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Occidente, mediante la combinación de una fase sólida compuesta por Fosfato tricálcico (EMPROVE / Merck), Óxido de calcio, y Óxido de zinc, como fase líquida se incorporó Quitosano, (Polymar), a un pH de 7,5.

Los biomodelos fueron sedados con Ketamina 50 mg/ml, (0,7 mg por kilogramo); Xilacina al 2%, (0,6 mg por kilogramo), y Maleato de Acepromacina 10 mg/ ml (0,6 mg por kilogramo). Los procedimientos se realizaron en el Bioterio de la Universidad del Valle, en Cali, Colombia, los protocolos éticos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad del Valle.

Una vez cumplido los tiempos de implantación, las muestras fueron recuperadas y fijadas en glutaraldehído al 2.5% por 48 horas a 4°C. Luego lavadas en tris buffer salino y desmineralizado en solución de EDTA al 15% en agua, por 2 meses. Las muestras fueron lavadas en TBS, deshidratadas y embebidas en parafina. Se obtuvieron cortes a 5 micrómetros y se tiñeron con hematoxilina-eosina, Tricromica de Masson, y Tricromica de Gomori para retículo.

Se utilizó técnica de inmunohistoquímica usando estreptavidina-biotina-peroxidasa para detectar antígeno específico de actina en músculo liso humano, en dilución 1:40 (células musculares lisas, pericitos) y TRAP, en dilución 1:40 (Osteoclastos).

Las secciones fueron incubadas con anticuerpo secundario (1:200) por 1 hora, y luego se lavaron con TBS y se incubaron con Diaminobenzidina y contraste con hematoxilina.

3 RESULTADOS

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron sin complicaciones. Después de los períodos de implantación se observó macroscópicamente que el defecto control, permaneció sin evidencias de neoformación ósea, cubierto sólo por una capa de tejido blando, a diferencia del defecto injertado que mostraba señales de biointegración y neoformación ósea

3.1 Histoquímica

3.1.1 Período de 20 días

Se observó un defecto que contenía un biomaterial en diferentes estados de disolución, que presentaba una reacción inflamatoria crónica con presencia predominante de linfocitos e histiocitos, y una marcada fibrosis.

Se observaron osteoblastos en la superficie de columnas óseas nuevas, a lo largo de haces colágenos, que se incorporaron en micro columnas circulares y longitudinales de hueso. Los osteoblastos que se incorporaron a cada nueva columna estaban rodeados por grandes senos vasculares.

Se evidenciaron fibras colágenas y reticulares que atravesaban el material en diferentes direcciones, cantidades y tamaños. Las fibras colágenas parecían dividir el material en septos. Las fibras reticulares fueron abundantes dentro del biomaterial, el periostio y hacia las columnas óseas. Estas se continuaron directamente con el borde óseo penetrándolo longitudinalmente.

3.1.2 Período de 40 días

Se encontraron células gigantes similares a osteoclastos (TRAP +) células linfo-histiocitarias en menor abundancia, y abundancia de osteoblastos alrededor de espículas óseas. Las fibras colágenas y reticulares se encontraron en menor densidad. Fue posible identificar espículas óseas dentro del biomaterial.

3.1.3 Período 60 días

Este período se caracterizó por la presencia de hueso maduro, con osteoblastos y células similares a osteoclastos en forma moderada con diferenciación perióstica en los extremos externo e interno. En comparación con estos hallazgos, en el defecto control no se apreció neoformación ósea, aunque se observó un puente de colágeno uniendo los extremos del defecto.

3.2 Inmunohistoquímica.

3.2.1 Expresión de actina alfa de músculo liso

Se encontró reacción positiva para la actina alfa de músculo liso humano, la cual presentó inmunoreacción citoplásmica en células musculares lisas y pericitos de vasos sanguíneos localizados en el periostio. Los macrófagos y mio-fibroblastos alrededor del biomaterial presentaron una marcada inmunoreacción citoplásmica. Dicha reacción también estuvo presente en el intersticio entre los diferentes fragmentos. La inmunoreacción se siguió presentando con menor intensidad en las mismas células en los períodos de 40 y 60 días.

3.2.2 Anticuerpo anti TRAP de Ratón

No se identificó expresión de células TRAP positivas a los 20 días. En los días 40 y 60 se observó inmunoreacción citoplásmica en células multinucleadas, similares a osteoclastos

4 DISCUSIÓN

La cicatrización ósea presentada en los biomodelos corresponde al comportamiento de un defecto crítico [11]. La respuesta tisular ante el injerto con la biocerámica muestra una respuesta normal [4, 5, 6, 7,12], mostrando un proceso inflamatorio evidenciado por la presencia de linfocitos, monocitos y macrófagos. A partir del día 7 se encontró angiogénesis, actividad osteoblástica y depósito de material osteoide y posterior mineralización lo cual está de acuerdo con lo reportado [4,5].

En el período de 20 días se evidenció la presencia de abundante infiltrado inflamatorio con predominio de linfocitos e histiocitos, así como macrófagos y mio-fibroblastos rodeando el biomaterial; de manera similar a lo reportado por Ghanaati, et al. [9], en su descripción del proceso inflamatorio durante la implantación cutánea de fosfato tricalcico.

En los períodos de 40 y 60 días se encontraron unas células gigantes multinucleadas TRAP positivas, similares a osteoclastos, y que parecen corresponder a las reportadas por Ghanaati, et al [9], quien plantea que éstas serían inducidas por las mismas partículas de β - fosfato tricalcico, aumentarían notablemente después del día 10 y disminuirían hacia el día 60. Estas células estarían relacionadas con la degradación del material cerámico.

Esta degradación dependiente de células también ha sido descrita por Lu. et al [6]; Oh et al [13]; y Siyu, et al. [14] quienes han mostrado que el fosfato tricalcico in vitro activa y diferencia osteoclastos.

El establecimiento de una matriz de colágeno es prerequisite para la neoformación ósea [4, 5]. En el presente trabajo se observa desde los 20 días presencia de una matriz extracelular con fibras de colágeno tipo I y III, que sirven de soporte a células osteoblasticas y a vasos sanguíneos.

En los períodos de 40 y 60 días se aprecian células similares a osteoclastos, hay formación de tejido óseo mineralizado con presencia de osteoblastos a los lados de columnas óseas. El hallazgo de estos dos tipos celulares y la neoformación ósea ya habían sido reportados por Nobuaki, et al [1] para un material compuesto por fosfato tricalcico y médula ósea en un defecto de tamaño “no crítico”.

Sader, et al [15] han demostrado el efecto del fosfato tricalcico en la diferenciación y adhesión de osteoblastos humanos; hallazgo que coincide con los de Siyu, et al [14] in vitro para silicato de calcio y fosfato tricalcico.

5 CONCLUSIONES

Al comparar las tres etapas de implantación (20, 30 y 60 días), es posible observar que la biointegración del fosfato tricalcico es un proceso tiempo dependiente, en el cual inicialmente hay un proceso inflamatorio, una cualificación de células, caracterizado por la presencia de células gigantes multinucleadas TRAP positivas encargadas de la degradación del material cerámico, y simultáneamente aparición de células óseas, (osteoblastos), con establecimiento de una red vascular y colágena (Colageno tipo I y III), depósito de material osteoide, su mineralización, y posterior maduración.

Durante el proceso de degradación del biocompuesto y reemplazo por tejido óseo son determinantes las relaciones que se establecen entre el biomaterial y las células en las dos interfaces propuestas.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nobuaki, S. Takaaki, U. Yasuhisa, H.; et al. “Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate”. *Acta histochemica* 112: 270—277. 2010.
2. Bohner, M.; Galea, L.; Doebelin, N. “Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes”. *Journal of the European Ceramic Society* 32: 2663–2671. 2012.
3. Rodil, S. “Modificación superficial de biomateriales metálicos”. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*. 29 (2): 67 -83. 2009.
4. Davies, J.E, Hosseini, M.M. “Histodynamics of Endosseous Wound Healing”. (Davies, J.E. “Bone Engineering”. Em squared incorporated. Pag. 1:11. 2000).
5. Anderson, J.M. “The Cellular cascades of Wound Healing”. (Davies, J.E. “Bone Engineering”. Em squared incorporated. Pag. 81:93. 2000).

6. Lu, J., Descamps, M.; Proust, J.P. et al. "The Biodegradation Mechanism of Calcium Phosphate Biomaterials in Bone". *J. Biomed. Mater Res (Appl Biomater)* 63:408–412, 2002.
7. Shahram, G.; Mike, B., Carina, O.; et al. "Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo". *Acta Biomaterialia* 6, 4476–4487. 2010.
8. Calvo, JL; Delgado, RA; Ramirez, MP.; et al. "Histomorphometric and mineral degradation study of Osscerams: a novel biphasic B-tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits". *Clinical Oral Implant Research* 23, 667–675. 2012
9. Ghanaati, S.; Barbeck, M.; Orth, C.; et al. "Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo". *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 4476–4487.
10. Lange, T.; Schilling, A.; Peters, F.; et al. "Size dependent induction of pro inflammatory cytokines and cytotoxicity of particulate beta-tricalcium phosphate in vitro". *Biomaterials* 32 4067e4075. 2011
11. Schmitz, JP. ; Hollinger, J.O.; "The critical size defect as an experimental model for cranio mandibulofacial non unions". *Clin Orthop Relat Res.* Apr; (205):299-308. 1986.
12. Anderson, J. "Biological responses to materials". *Annu. Rev. Mater. Res.* 31:81–110. 2001.
13. Oh, S.A.; Lee, G.S.; Park, J.H.; Kim, H.W. "Osteoclastic cell behaviors affected by the a-tricalcium phosphate based bone cements". *J Mater Sci: Mater Med* 21:3019–3027. 2010.
14. Siyu, N.; Jiang, C.; Lee, C.; Wanyin, Z. "Comparison of Osteoblast-Like Cell Responses to Calcium Silicate and Tricalcium Phosphate Ceramics In Vitro". *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 80B: 174–183, 2007.
15. Sader, M.; LeGeros, R.; Soares, G. "Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium-substituted tricalcium phosphate dense tablets". *J Mater Sci: Mater Med* 20:521–527. 2009).