

ARTICULOS ORIGINALES

Características osteoconductoras de la Hidroxiapatita Sintética y la derivada de corales marinos injertadas en conejos. Análisis descriptivo.

Carlos Riaño, ¹MVZ; Alejandro Echavarría, ²IM; Gloria Ramírez, ¹MVZ; Ivan G. Escobar, ¹MV;
Jhon J Cardona, ²IM; Adriana E Giraldo, ²IM.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
²Departamento de Ingeniería Metalúrgica y de Materiales
Universidad de Antioquia, AA 1226 Medellín, Colombia

(Recibido 8 abril, 99; aprobado 21 mayo, 99)

Resumen

Se presenta el procedimiento de obtención de Hidroxiapatita (HA) sintética, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, a partir de fosfato de amonio y nitrato de calcio. Se incorporan fibras de celulosa, con el propósito de obtener una buena cristalización de HA y combustión de la celulosa formando un material poroso. Los análisis muestran alta proporción de HA y menor cantidad de fosfatos tetracálcico y tricálcico.

Muestras de coral tratadas con fosfato de amonio (vía Hidrotérmica) y muestras de coral precalentadas a 650 y 1000°C, sumergidas en fosfato de amonio y posteriormente tratadas a 1050°C (vía pirotérmica), fueron evaluadas mediante Difracción de Rayos X (DRX).

Por la vía hidrotérmica no se obtuvo descomposición apreciable de la red de Aragonito típica del coral y la vía pirotérmica propuesta, exhibe una baja o nula cantidad de HA

Los resultados indican que no es posible obtener HA a partir del coral bajo las condiciones experimentales evaluadas y que la coralina no se comporta como un material biocompatible para obtener regeneración ósea.

Por último, al colocar injertos aloplásticos de HA, se observó buena integración de estos al hueso; los procesos de remodelación y reparación ósea fueron adecuados y evolucionaron de forma normal. Sin embargo, el grupo que recibió como injerto aloplástico la coralina presentó necrosis y lisis del hueso con marcada reacción inflamatoria.

Palabras clave: Fosfato de calcio, Hidroxiapatita, Injertos.

Introducción

En la práctica veterinaria de pequeñas especies, son comunes los episodios traumáticos con fracturas y pérdida abundante de tejido óseo. Son incontables los pacientes en quienes es difícil y hasta imposible realizar una buena reconstrucción del hueso en el que hay pérdida de fragmentos relativamente grandes y la única alternativa es la amputación del miembro. A ello le

debemos agregar la dificultad de reemplazar el tejido óseo perdido con injertos, por los altos costos.

En el perro se utilizan los injertos de costilla y cresta iliaca, pero su uso es poco frecuente pues supedita al paciente a una doble cirugía bajo anestesia general. También es necesario reconocer la mutilación del sitio donador, con la posibilidad de infección y del rechazo siempre latente cuando se utilizan tejidos vivos (2).

Estos injertos no permanecen en el organismo receptor como una unidad aislada morfológica o funcionalmente. Su supervivencia está determinada por la capacidad para conservar su vascularización que poco a poco establece nexos con la del huésped para concretar su verdadera integración. Sus osteocitos sufren una serie de modificaciones y mueren, pero concomitantemente el hueso injertado es sustituido por uno nuevo (9).

Los injertos óseos son poco empleados y son escasas las referencias para obtener conclusiones definitivas sobre el resultado de su utilización (8). Sin embargo, es un procedimiento absolutamente viable que se puede practicar mediante el empleo de material obtenido de diferentes partes del esqueleto, especialmente de la cresta ilíaca.

Los esfuerzos para lograr un sustituto aceptable que reemplace al hueso autógeno en trasplantes quirúrgicos, han sido una inquietud permanente en nuestra profesión veterinaria. Son numerosos los elementos probados y descartados como también los ensayos basados en acrílicos y siliconas, sin que el resultado final haya sido el esperado, pues tan solo unos pocos pueden permanecer un tiempo prolongado o llenar los requerimientos básicos de un injerto ideal: que sea atóxico, no carcinógeno ni alergénico, resistente a la destrucción creada por los tejidos adyacentes, fácilmente esterilizables, de fácil manipulación, que permita la reparación tisular, con capacidad para incorporarse como parte misma del organismo receptor o de reabsorberse después de haber estimulado la neoformación ósea (2).

Los minerales porosos de calcio y fosfatos son una alternativa como sustitutos del hueso. Son biocompatibles y ofrecen una química y superficie que conducen a la nueva formación del hueso. Investigaciones recientes utilizan **HA** y **fosfato tricálcico** así como la combinación de estos dos minerales. (2, 3, 6)

También es factible la utilización de materiales inertes similares al hueso, tales como la HA sintética u obtenerla a partir de esqueletos de corales marinos con la ventaja de su porosidad que facilitaría la vascularización e integración del implante al hueso (6).

El uso de corales marinos, sería una posible solución a los problemas de los injertos óseos, debido a que su componente principal (el carbonato de calcio), podría ser convertido en hidroxiapatita pura o en fosfato

tricálcico mediante cambios hidrotérmicos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de la HA sintética y la HA derivada de los corales marinos como posible sustituto del mineral óseo.

Materiales y métodos:

La HA tiene por fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y es el constituyente mas parecido a la fase mineral de los huesos y los dientes (7). Su biocompatibilidad, ha sido ampliamente comprobada, así como los otros tipos de fosfatos de calcio, especialmente los tipos tricálcico y tetracálcico. La HA se puede producir por varios métodos:

1. Vía nitrato de calcio / fosfato de amonio
2. Vía ácido fosfórico / hidróxido de calcio
3. Vía coralina / fosfato de amonio.

Obtención y caracterización de HA sintética:

La reacción base para su obtención por la vía del nitrato de calcio/fosfato de amonio es:



La reacción anterior llega a completarse casi en un 100% en condiciones básicas y por ello, es imprescindible trabajar con un exceso de nitrato de amonio. Esta base es esencialmente importante en la síntesis de la HA, ya que en el caso de que el nitrato de amonio se atrape dentro de la matriz de HA en el proceso de precipitación, mediante el tratamiento térmico posterior (950-1050°C), ocurre la pirólisis del nitrato de amonio, volatilizándose completamente, sin dejar residuos sólidos (4).

Para la obtención y caracterización de la HA sintética se utilizaron reactivos analíticos y de acuerdo con el peso molecular y a la pureza, se calcularon las cantidades estequiométricas, para conseguir un total de 20 gr de HA. Se utilizaron 47.018 gr de nitrato de calcio y 13.88 gr de fosfato de amonio monobásico.

Preparación de la solución de Nitrato de Calcio:

Para la disolución del Nitrato de Calcio se utilizó un agitador mecánico, a 170 r.p.m., con aspas de acero inoxidable recubiertas con Resina de Poliester Andercol Cristalán 809TM utilizando recipientes de plástico, con el fin de evitar contaminación metálica, provistas de tapa perforada para evitar contaminación con polvo

de la atmósfera. Se disolvieron 47,018 gr. de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en 1100 ml de agua destilada para un pH inicial de cinco. Seguidamente se adicionaron 125 ml de NH_4OH para obtener un pH final de doce y por último se adicionaron agua destilada hasta un volumen total de 1800 ml.

Preparación del fosfato de amonio:

Se tomaron 13,88 gr. de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, se diluyeron en 1700 ml de agua destilada para un pH inicial de cinco. Luego se adicionó amoniaco (75 ml) para obtener un pH final de doce y se ajustaron 3000 ml de volumen total con agua destilada.

Procedimiento de reacción:

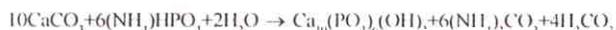
Se adicionó el fosfato de amonio sobre el nitrato de calcio a un flujo de 3000 ml/h, mediante manguera de caucho provista de dosificador de soluciones salinas, con agitación por 24 horas y seguida de reposo por el mismo tiempo para una decantación del supernatante. Posterior a ello se realizaron dos lavados con agua destilada con agitación durante una hora. Finalmente se hizo una separación sólido-líquido mediante un embudo Buchner y se tomaron 600 ml de solución con 10 gr de HA y se le adicionaron 3 gr de celulosa. Esta "tortilla" fue secada a 90°C / 15 horas y sinterizada una parte a 950°C y otra a 1050°C / 2.5 horas y se le realizó análisis de Difracción de Rayos X (DRX).

La celulosa se obtuvo por molienda de papel de filtro analítico en molino de martillos, utilizando malla de cribado de 3mm y extracción neumática. El objetivo de adicionar la celulosa, es que esta quede atrapada en el proceso de filtrado dentro de la tortilla de HA y con el tratamiento térmico de alta temperatura, 950°C o 1050°C , se desea que ocurra pirólisis de las fibras de celulosa, creando un poro, cuyo diámetro promedio es de 100 micras aproximadamente y a la vez mejorar la cristalinidad de la HA.

Caracterización de muestras de coral tratadas con fosfato de amonio por vías hidrotérmica y pirotérmica:

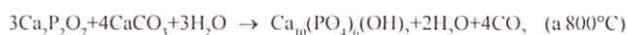
Los esqueletos de corales marinos, que corresponden a un carbonato de calcio y cuya red cristalina es del tipo aragonito, se pueden usar como base para lograr un intercambio de los carbonatos por los fosfatos y producir un material cuya red cristalina corresponda a la Hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La HA coralina tendría una excelente biocompatibilidad puesto que su porosidad es similar al de los sistemas Haversianos

normales de los huesos. La reacción base para la obtención de HA coralina es:



Según Roy *et al*, citado por Cardona 1997 (5), la reacción anterior requiere temperaturas de $250/260^\circ\text{C}$, 15000psi y tiempos hasta de 24 horas.

Arita *et al*, citado por Cardona 1997 (5), produce HA coralina, tomando como base las siguientes reacciones:



y partiendo de fosfato ácido de calcio.

Vía hidrotérmica:

Se cortaron fragmentos de coral de 1 cm^3 y se colocaron en solución de hipoclorito de sodio al 5% / 24 horas. Seguidamente se hizo un lavado con solución salina estéril y secado en horno a 100°C / 1 hora. Se preparó una solución mezclando partes iguales de fosfato ácido de diamonio y agua destilada, para colocar los fragmentos de coral a partes iguales por peso, en un recipiente de aluminio que poseía cierre hermético y se llevaron al autoclave por 24 horas. Se hicieron análisis de DRX, Análisis termogravimétrico (TGA) y Análisis térmico diferencial (DTA) (8).

Vía pirotérmica:

Cuatro muestras de coral de igual peso (2.53 gr) fueron calentadas por 0.5 h / 700°C la primera muestra, 800°C la segunda, 900°C la tercera y 1000°C la cuarta. Las cuatro fueron sumergidas en una solución preparada con 2.53 gr de fosfato de amonio y 146 ml de agua destilada y luego se trataron a 1050°C / 2.5 h. En este ensayo, se tomaron difractogramas solamente (8).

Descripción de las características osteointegradoras de la HA sintética y Coralina (HA derivada de corales marinos)

En esta investigación se utilizó el protocolo experimental F 981-93 de ASTM para evaluar la reacción de los tejidos a biomateriales utilizados en injertos quirúrgicos.

Se trabajó con un total de 24 conejos machos, adultos, raza Nueva Zelanda, divididos en tres grupos al azar así:

- Grupo 1: Grupo control, para apreciar el tiempo normal de regeneración ósea.
 Grupo 2: Grupo de injerto aloplástico con HA sintética.
 Grupo 3: Grupo de injerto aloplástico con Coralina. (HA derivada de corales marinos).

Cada grupo estaba formado por ocho conejos, de los cuales dos de cada grupo se sacrificaron semanalmente.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones similares de alimentación y bajo parámetros ambientales estables de temperatura. Las características de manejo pre y postoperatorio se mantuvieron constantes.

A todos los pacientes, previo examen clínico y mediante procedimientos quirúrgicos se les creó un defecto óseo de forma circular de 2 mm de diámetro y de profundidad igual al espesor de la corteza, en el tercio proximal de la tibia, cara medial, para la colocación del injerto por presión digital. A todos los animales se les colocó el injerto en la misma sesión quirúrgica y con la cautela necesaria para impedir su movimiento en los tejidos.

El manejo postoperatorio consistió en mantener una terapia antibiótica con Ampicilina a dosis terapéutica con limpieza y desinfección del área quirúrgica dos veces al día, hasta que la cicatrización superficial fuese completa (promedio diez días), teniendo cuidado para asegurar que los animales no se lesionaran o se contaminaran antes o después del injerto.

La evaluación de los pacientes se hizo mediante examen clínico diario: aumento de la temperatura, ede-

ma, dolor, cojera, limitación funcional, desplazamiento, toma de alimento.

Se tomaron radiografías de cada individuo inmediatamente después de la cirugía y antes del sacrificio. Las placas se tomaron en posición lateral y anteroposterior y se evaluaron los siguientes parámetros: incremento de la densidad en los bordes del orificio, cambios óseos con relación al injerto aloplástico, absorción del injerto, migración del injerto, reacción perióstica, penetración del injerto a través del hueso y fractura del hueso.

Se sacrificaron dos animales de cada grupo, con el fin de tomar las muestras para el examen histopatológico a la primera, segunda, tercera y cuarta semana postquirúrgica.

El animal que murió antes de la fecha esperada para el sacrificio, fue examinado para determinar la causa de su muerte y se acordó incluirlo en la prueba.

Antes de tomar la muestra para la biopsia, se hizo la valoración macroscópica de la zona injertada. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina. En la descripción microscópica se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros: duración del injerto en semanas, fibrosis alrededor del injerto, yemas vasculares y/o vasos sanguíneos, inflamación, leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, eosinófilos, células plasmáticas, macrófagos, degeneración, células gigantes, reacción a cuerpo extraño, formación ósea, integración del injerto al hueso y necrosis.

Para la evaluación se tomó un puntaje de 0 a 3 basado en el número de elementos en alto poder (470 X) de un promedio de 5 campos.

(Ver tabla N° 1)

Tabla 1 *Tiempo de Evolución al momento del sacrificio*

Tiempo	Control	HA	Coralina
1 semana	Conejo N° 1 y 2	Conejo N° 1 y 6	Conejo N° 1 y 2
2 semana	Conejo N° 3 y 4	Conejo N° 2 y 3	Conejo N° 3 y 6
3 semana	Conejo N° 5 y 6	Conejo N° 4 y 5	Conejo N° 4 y 5
4 semana	Conejo N° 7 y 8	Conejo N° 5 y 6	Conejo N° 5 y 6

Resultados

1. *Preparación de materiales.* A las muestras de HA tratadas a 950 y 1050°C por 2.5 horas, se les hizo DRX en Difractómetro SHIMADZU, con cátodo de CuK, conteos de 2000 cps, velocidad de 2°/min., constante de tiempo = 1, velocidad del papel: lenta. La muestra obtenida con reactivos analíticos contiene HA cerca del 85% y el 15% restante es fosfato tetra-cálcico y fosfato tri-cálcico del tipo whitlockita.

El aumento de la temperatura desde 950 a 1050°C mejoró la resistencia compresiva aunque no fue sistemáticamente evaluada.

Puesto que la muestra contiene básicamente fosfatos de calcio del tipo HA y fosfatos de calcio tetra-cálcicos y tri-cálcicos con una estructura porosa, se esperan características de buena biocompatibilidad y ausencia de reacciones adversas en el hueso en el proceso de osteointegración.

2. La muestra de coral tratada por vía hidrotérmica con fosfato de amonio, siguiendo el procedimiento sugerido para su tratamiento en autoclave a 130°C, 24 psi y 24 horas, solo mostró una pequeña cantidad (5% aproximadamente) de HA. El resto (95%), correspondió a la estructura del aragonito, CaCO₃, típica de los corales marinos. Por lo tanto, la descomposición del aragonito por la vía hidrotérmica fue muy baja.

El TGA para estas mismas muestras permite aclarar el proceso de liberación del agua atrapada en la red cristalina, (a temperaturas entre 320 y 350°C) y del CO₂ (desde 600 hasta 800°C) con una pérdida de peso muy importante. El DTA confirmó estas dos reacciones de una manera endotérmica, siendo mas fuerte en el caso del desprendimiento del CO₂ que en el caso del agua atrapada en la red cristalina.

Las muestras de coral tratadas a temperaturas entre 650 y 1000°C /0.5 horas, sumergidas en fosfato de amonio y calentadas de nuevo a 1050°C /2.5 horas, no mostraron HA sino un tipo de fosfato de calcio, el cual no fue posible identificar ni como mono-cálcico, di-cálcico, tri-cálcico o tetra-cálcico. La máxima cantidad de este compuesto se encontró cuando la descomposición del coral se llevó a cabo a 800°C /0.5 hora. Si la temperatura era superior o

inferior a esta, aparecían muy posiblemente, fosfato tri-cálcico y en menor cantidad fosfato tetra-cálcico, ambos de muy baja cristalinidad.

3. *Examen Clínico:* Los parametros de aumento de temperatura, inflamación, edema, exudados, apoyo de miembro afectado y otros no presentaron ninguna alteración en el grupo control; para el grupo injertado con Hidroxiapatita se aprecia inflamación de leve a moderada con apoyo entre los 2 y 4 días, mientras que en el grupo N° 3 se presenta inflamación severa en la mayoría de los animales y edema de levé a moderado al igual que los exudados
4. *Evaluación radiológica:*

Grupo Control. En las radiografías tomadas inmediatamente después de la cirugía, se pueden observar los orificios en la cara medial del tercio proximal de la tibia de todos los pacientes a excepción del número cuatro en el que este orificio se encuentra a nivel del tercio medio. Dos semanas después de la cirugía se empiezan a apreciar cambios radiológicos como aumento de la densidad en el orificio, lo cual nos indica que puede haber cambios en su contenido. A las tres semanas, se pudo apreciar aumento en la radioopacidad de los bordes del orificio, indicativo de osteogénesis y a la cuarta semana los orificios se encontraban completamente cerrados. En ninguno de los pacientes se presentaron cambios como osteolisis o reacción perióstica.

Grupo Hidroxiapatita. Inmediatamente después de la cirugía, se pueden observar partículas radioopacas de aproximadamente 1 a 3 mm en el orificio.

1 semana: injerto en su sitio, sin reacción perióstica ni inflamatoria.

2 semanas: se puede apreciar reabsorción del injerto, indicada por disminución en su radioopacidad.

3 semanas: disminución en el tamaño del injerto.

4 semanas: la densidad en el área del defecto es muy similar a la del hueso sano.

Grupo Coralina. En las radiografías tomadas el día de la cirugía se pueden apreciar muy bien los orificios, pero no el injerto colocado debido a que este material no es muy radioopaco.

A las 3 y 4 semanas se puede apreciar aumento de tamaño del orificio, posible indicativo de lisis ósea.

5. *Evaluación microscópica.* La evaluación histopatológica de los huesos injertados permite destacar en forma importante los siguientes aspectos: En el grupo control, el proceso de remodelación y reparación ósea, siguió los patrones normales de desarrollo, permitiendo la recuperación de la lesión causada al hueso en forma exógena. No hubo evidencia de inflamación.

En el grupo que recibió el injerto de HA sintética se puede destacar en forma general una reacción mononuclear y gigantomocelular de leve a moderada que en ningún momento interfiere con la actividad de remodelación ósea. Se aprecia buena integración del implante al hueso. Los procesos de remodelación y reparación ósea son adecuados y evolucionan de forma normal.

A diferencia de los grupos control y de Hidroxiapatita, el grupo que recibió como injerto aloplástico la coralina, presentó con frecuencia necrosis y lisis del hueso, con abundantes detritus celulares, marcada reacción inflamatoria polimorfonuclear y gigantomocelular acompañada de fibrina. Ocasionalmente el implante no se encontró en el lugar del defecto.

Hallazgos específicos.

Grupo Control:

Nº 1. (1 semana): Fibrosis densa, espículas óseas activas, osteoide, pocos plasmocitos, escaso infiltrado mononuclear, presencia de yemas vasculares.

Nº 2. (1 semana): Infiltrado inflamatorio de tipo plasmocitario, fibrosis densa, actividad celular en las espículas. Hay remodelación de adentro hacia afuera.

Nº 3. (2 semanas): Fibrosis de tipo superficial, espículas óseas activas, mínima reacción inflamatoria. Hay presencia de vasos mas gruesos.

Nº 4. (2 semanas): Fibrosis con marcada actividad osteoblástica y baja reacción inflamatoria.

Nº 5 y 6. (3 semanas): Reacción fibrosa perióstica con vasos engrosados, debajo de los cuales hay formación de hueso inmaduro y mínima reacción inflamatoria. Hacia adentro, el tejido fibroso ha sido parcialmente reemplazado por hueso.

Nº 7 y 8. (4 semanas): Fibrosis perióstica densa, formación ósea inmadura y madura; persiste fibrosis en el defecto con marcada reparación ósea, osteoblastos activos y mínima reacción inflamatoria. Neovascularización reducida.

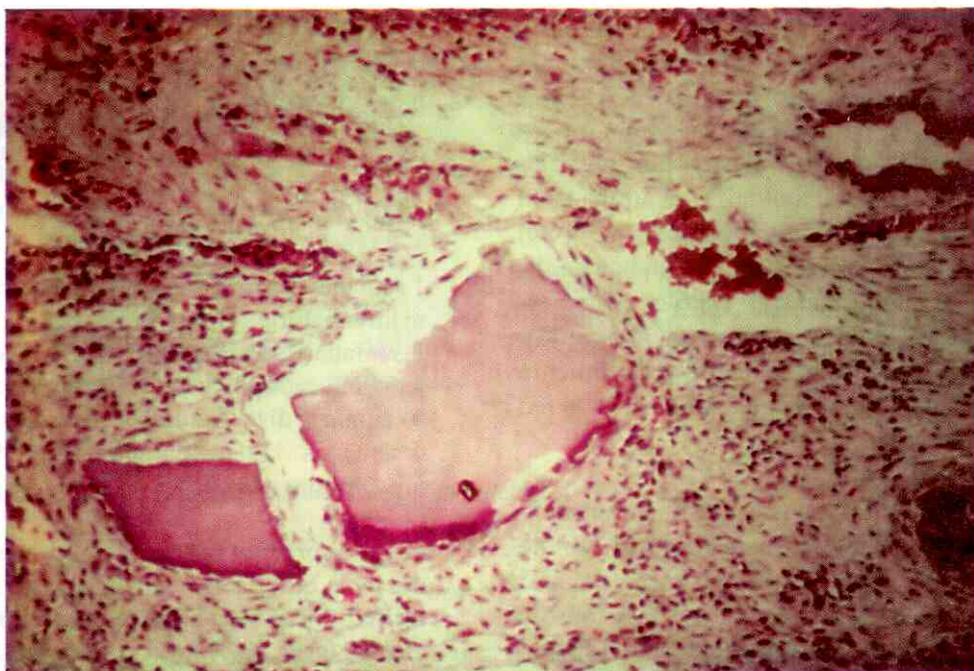


Figura 1. *Implante de Hidroxiapatita rodeado de tejido fibroso, infiltrado inflamatorio mononuclear, neovascularización y actividad osteoblástica en la periferia. H-E. 10X.*

Grupo Hidroxiapatita:

N° 1. (1 semana): Fibrosis densa alrededor del injerto con presencia de inflamación mononuclear y neovascularización.

N° 6. (1 semana): Hay poca fibrosis y escasa reacción gigantocelular y neovascularización. Hay incorporación del injerto al tejido con pocas células mononucleares.

N° 2. (2 semanas): Reacción gigantocelular moderada con actividad de remodelación. Actividad ósea alrededor del implante con poca inflamación.

y neoformación ósea con algunas trabéculas maduras. Alrededor de algunos cuerpos extraños hay polimorfonucleares y el proceso está delimitado por tejido conectivo.

N° 7. (4 semanas): Por debajo del periostio hay neoformación de hueso muy en contacto con algunas espículas maduras. Abundantes células estromales estrelladas. Hay espículas óseas bien formadas alrededor del injerto, reacción gigantocelular de cuerpo extraño que contiene espículas en su interior en cuya vecindad hay depósitos de hueso. Acúmulos focales de plasmocitos. Alrededor de algunas espículas óseas



Figura 2. *Cristal de Hidroxiapatita integrada a espícula ósea joven con gran actividad osteoblástica. H-E. 40X.*

N° 3. (2 semanas): Gran actividad ósea alrededor del injerto y poca reacción inflamatoria. El injerto se encuentra casi entero y está bien incluido en el hueso.

N° 4. (3 semanas): Hay gran integración del injerto al hueso; está bien delimitado por tejido conectivo y espículas óseas alrededor del mismo. Hay neoformación ósea en íntimo contacto con los fragmentos del injerto. El infiltrado inflamatorio es escaso al igual que los acúmulos plasmocitarios. La reacción perivascular de cuerpo extraño es escasa. La vascularización es notable.

N° 5. (3 semanas): Hay presencia de eosinófilos-plasmocitos y mucho infiltrado. Alrededor del injerto hay proliferación fibroblástica, neoformación de vasos

se ven acúmulos de osteoblastos. En otras áreas el injerto se rodea de tejido fibroso.

N° 8. (4 semanas): Hay reacción fibrosa alrededor del injerto con acúmulos mononucleares y espículas alrededor del mismo con buena vascularización y congestión. (Figuras 1 y 2)

Grupo Coralina:

N° 1. (1 semana): Fibrosis, neovascularización, células gigantes, espículas óseas activas. Hay material que indica necrosis y lisis. Se ve el injerto en partículas pequeñas azules con reacción gigantocelular de cuerpo extraño con inflamación moderada.

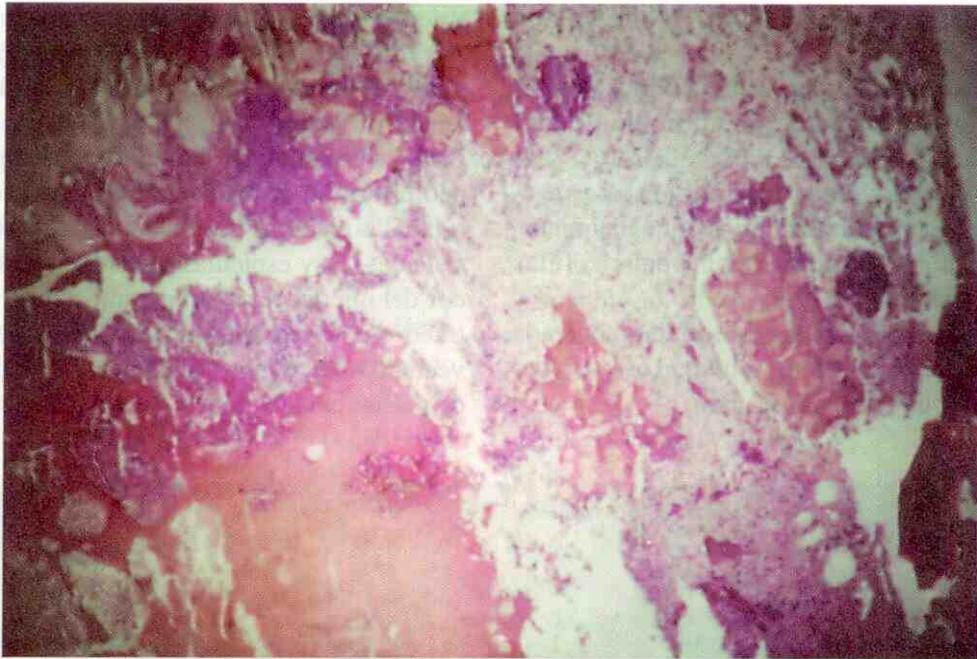


Figura 3. Implante de coral con 15 días de evolución. Tejido fibroso, fibrina, infiltrado inflamatorio mononuclear difuso, cristales y neovascularización, escasa formación ósea. H-E. 5X.

Nº 2. (1 semana): Hacia la periferia hay reacción mononuclear con pocos polimorfos y abundante fibrina. El injerto no está en el lugar del defecto. Hay mucha presencia de células gigantes multinucleadas.

Nº 3. (2 semanas): Espículas muy activas, tejido fibroso, neovascularización con infiltrado inflamatorio, polimorfo, plasmocitos, muchas células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño. El injerto no se encuentra en su sitio. La regeneración ósea es mayor donde hay células gigantes.

Nº 6. (2 semanas): Tejido fibroso y presencia de mucha necrosis. Actividad de regeneración ósea. Hay hueso desvitalizado en donde se creó el defecto. Abundante detritus celular y actividad osteocítica con citoplasma abundante y núcleo estrellado.

Nº 4 y 5 (3 semanas): Abundante tejido fibroconectivo denso; en algunas áreas, fibroblastos muy activos que se disponen alrededor del material extraño. Células gigantes multinucleadas de tipo cuerpo extraño. Hay neovascularización con marcada congestión vascular. Hay abundante reacción inflamatoria mixta, tejido necrótico mezclado con fibrina y detritus celulares entre el material extraño. Hay neoformación ósea alrededor del tejido que limita el injerto y en otras áreas, muy adosado al mismo. En algunos focos hay abundantes polimorfos nucleares, eosinófilos y lipófagos. El cuerpo extraño está englobado en algunas zonas por células gigantes.

Nº 7. (4 semanas): Reacción fibroblástica en el periostio con neoformación ósea; extensa reacción gigantocelular en cuyo interior hay material extraño. Abundantes detritus celulares, fibrina y fibrosis que engloba lo descrito. Vascularización acentuada y lipofagos.

Nº 8. (4 semanas): Se insinúan espículas óseas dentro de la cavidad en la que está inmerso el injerto. Hay reacción inflamatoria gigantocelular alrededor de fragmentos del injerto. Lipofagos. Buena vascularización. Reacción fibrosa perióstica. Hay reparación mas adecuada, espículas que llegan desde la periferia hacia el lugar del injerto. Persiste abundante fibrina en la mitad del injerto. (Figuras 3 y 4)

Discusión

La investigación para el uso de injertos en huesos se ha enfocado hacia diferentes alternativas biológicas. Se han procesado materiales de diferente origen, usando técnicas diferentes y realmente han sido efectivos en la práctica clínica. Su aplicación sin embargo, permanece restringida por limitaciones tales como la pronta disponibilidad, volumen, etc. Por esto, ha aumentado el interés en los materiales sintéticos y bioinertes como sustitutos del hueso.

En la primera parte de nuestro trabajo, usando reactivos analíticos, se obtuvo una muestra que contiene 85% de Hidroxiapatita y 15% de fosfatos tetracálcico y tricálcico del tipo whitlockita. El aumento de temperatura en el tratamiento térmico, desde 950° a 1050°C aumentó la "Resistencia Compresiva", aunque no fue sistemáticamente evaluada.

Puesto que la muestra contiene básicamente fosfato de calcio del tipo Hidroxiapatita y fosfato de calcio tetracálcico y tricálcico con estructura porosa, se obtienen características de biocompatibilidad sin reacciones adversas en el hueso, en el proceso de osteointegración.

Los resultados indican también, que no es posible obtener HA a partir de coral bajo las condiciones experimentales evaluadas y que la coralina no se comporta como un material biocompatible en injertos.

En el grupo control de modelos animales, el proceso de reparación y remodelación ósea siguió los patrones normales de desarrollo, permitiendo la recuperación de la lesión causada al hueso en forma exógena. No hubo evidencia de proceso inflamatorio de importancia y las pocas células inflamatorias encontradas fueron principalmente de tipo plasmocítico. En la primera observación realizada a los ocho días, y por los hallazgos de fibrosis densa y osteoide, se puede afir-

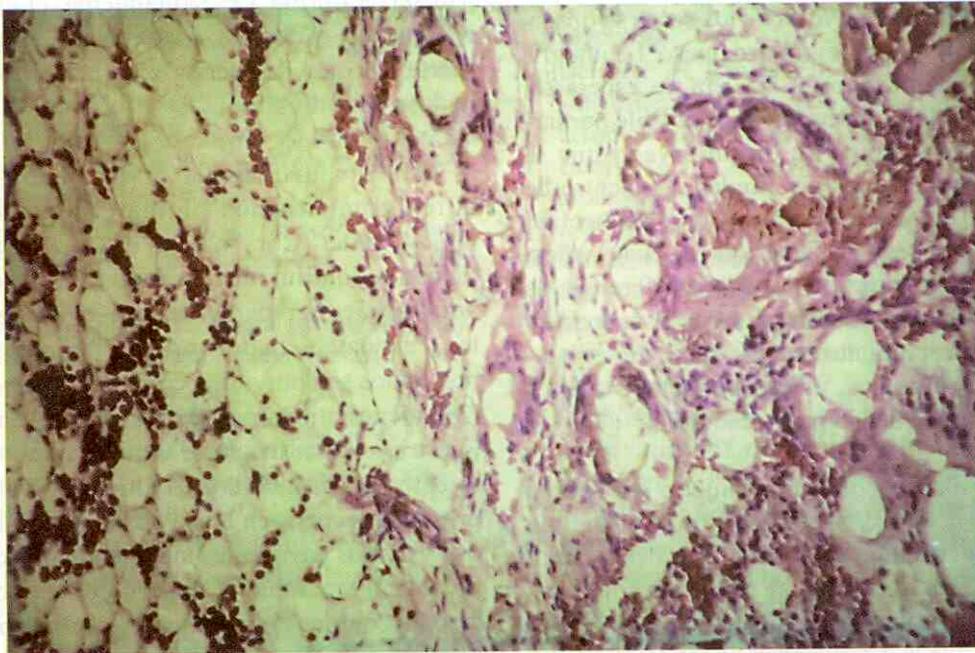


Figura 4. Implante de coral. Reacción gigantocelular alrededor de material extraño, neoformación ósea e infiltrado inflamatorio mononuclear y fibrosis. H-E. 10X.

mar que el hueso se encontraba en el tercer estadio de la reparación (1). La presencia de yemas vasculares proporciona un ambiente vascular adecuado para la proliferación de células osteogénicas en el sitio del defecto. A las tres semanas se pudo observar hueso inmaduro que concuerda con lo observado radiológicamente en ese mismo tiempo y a los treinta días, hay hueso maduro en el defecto creado.

En el grupo de animales que recibió el injerto con HA hay que destacar la reacción mononuclear y

gigantocelular de leve a moderada, que no interfiere con la remodelación ósea. Se aprecia buena integración del injerto aloplástico al hueso. Los procesos de reparación y remodelación ósea evolucionaron de forma normal al ser comparados con el grupo control. Es decir, a los ocho días se pudo apreciar neovascularización y remodelación ósea, con poca inflamación, principalmente de tipo mononuclear. A las dos semanas se observó reacción gigantocelular leve, que concuerda con el hallazgo radiológico, de cambio en la radioopacidad del implante.

Se ha sugerido que las células gigantes multinucleadas tienen actividad osteoclástica y está confirmado que la formación y reabsorción del hueso es un fenómeno relacionado con los osteoblastos y osteoclastos, pero el mecanismo por el cual los macrófagos afectan el tejido reticular en los espacios medulares, aún está por ser descubierto (9).

Se piensa que los macrófagos pueden efectuar la diferenciación de células en el tejido reticular y estimular los osteoblastos. Una activa formación ósea ocurre continuamente sobre las trabéculas que se encuentran en el tejido reticular, lo que sugiere que la mayor parte de esta área puede ser reemplazada por tejido óseo.

Llama la atención la alta actividad ósea alrededor del injerto, el cual en la mayoría de los casos se observó casi completo y muy integrado al hueso. La integridad del injerto aloplástico de HA era de esperarse, pues en otros estudios ha permanecido estable por largos periodos de tiempo. Se ha observado que la neoformación ósea se localiza alrededor y dentro de los poros de la HA con crecimiento de tejido conectivo y haces vasculares luego de un periodo de cuatro años, sin reabsorción del material injertado, a diferencia de lo que ocurre con el coral natural, el cual, cuando es injertado sin un tratamiento previo, inicia inmediatamente la formación ósea, al mismo tiempo que es reabsorbido y reemplazado por hueso nuevo (14)

A los veinte días de colocado el injerto se observó vascularización notable y hueso neoformado. Ogilvie et al, citados por Hashimoto-Uoshima (9), demuestran como la mineralización biológica comienza con el depósito y crecimiento entre los pequeños cristales de HA y sostienen que la osteogénesis es inducida dentro y alrededor de la HA.

Summary

In this study we present the procedure to obtain synthetic Hydroxiapatite (HA) from ammonium phosphate and calcium nitrate sources. Cellulose fibers were incorporated with the purpose to achieve a good crystallization of HA and combustion of the cellulose was performed in order to produce a porous-like material. The X-ray diffraction analysis (XRD) showed a high proportion of HA with small quantities of tricalcium and tetracalcium phosphates. Coral samples treated with ammonium phosphate by a hydrothermal procedure or coral samples pre-heated at 650 and 1000°C submerged in ammonium phosphates and later on treated at 1050°C by a pyrothermal procedure were also evaluated by XRD. The hydrothermal technique did not produce decomposition of the typical aragonite frame of the coral, whereas the pyrothermal technique did not produce any quantity of HA.

La HA obtenida para este estudio mostró ser biocompatible con el tejido, pero se debe evaluar su resistencia mecánica y su comportamiento como injerto aloplástico al ser moldeada en diferentes formas y tamaños de los poros, así como su reabsorción a través del tiempo, para confirmar si es factible usarla como injerto aloplástico o como cubierta de prótesis de otros materiales.

El grupo que recibió como injerto aloplástico el coral procesado (Coralina), presentó necrosis y osteolisis desde los primeros análisis efectuados a los ocho días postcirugía, con abundantes detritus celulares lo que afectó en forma notable los procesos de remodelación y reparación ósea, mostrando marcada reacción inflamatoria polimorfonuclear y gigantocelular acompañada de fibrina. Ocasionalmente, el implante no se encontró en el defecto, casos en los cuales se observó fuerte reacción de cuerpo extraño hacia el periostio e incluso en el músculo.

Este estudio es similar al reportado por Mora (14) quien comparó dos biomateriales en defectos periodontales (Coral natural e HA porosa), con un sitio control que no fue rellenado. Ellos encontraron favorable para la reparación ósea, el rellenar los defectos con cualquiera de los dos materiales (10). Iguales resultados se obtuvieron en el trabajo de Bolívar et al (3) quienes utilizaron injertos de coral en caninos. En nuestro trabajo, luego de someter el coral a un tratamiento pirotérmico con el ánimo de obtener HA, se presentó necrosis en la mayoría de los huesos injertados y tejidos adyacentes incluyendo músculos, debido posiblemente a que el material obtenido no fue HA sino un compuesto fosfatado, y el cual, por su estructura pulverizada, era difícil mantener en el mismo sitio.

Finally, a good integration of the HA was observed when HA was implanted to tibial bone in dogs; remodeling and reparation were optimal and evolved according to normal processes. However, the animals implanted with coraline showed necrosis, lisis and severe inflammatory reactions at the implantation sites.

These results indicate that it is not possible to obtain HA from coral under the experimental conditions here evaluated and that coraline did not behave as a good biocompatible material for implants.

Key words: *Calcium phosphate, Hidroxyapatite, Implants.*

Referencias.

1. Banks W. Histología Veterinaria Aplicada. México: Ed. el Manual Moderno. 1986; 730 p.
2. Bianco G. Implantes cilíndricos, Injertos óseos y Membranas de Politetrafluoretileno (PTFE) en animales de experimentación. Gaceta Implantológica. 1994; 17: 39-46.
3. Bolívar K, Sacotto V, Riaño C. Utilización de implantes de corales marinos en la reparación de defectos óseos en pacientes caninos. Santafé de Bogotá D.C. Tesis Med Vet. UDCA Fac. Med. Vet. 1994
4. Boyne P. Hydroxyapatite coatings on dental implants. Bone response to HA. J. Oral Implantology. 1994; 20: 227-231
5. Brindley G W and Brown G. Crystal structures of clay minerals and their X-Ray identification. Mineralogical Society. London. 1980.
6. Cardona J J. Obtención y caracterización de Hidroxiapatita sintética. Universidad de Antioquia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Metalúrgica y Materiales. Medellín 1997.
7. Cranin A. Hydroxylapatite coated endosteal implants from the clinicians perspective. J. Oral Implantology 1994; 20: 235-239.
8. Degroot K Hydroxylapatite coatings for dental implants. J. Oral Implantology. 1994; 20: 232-234
9. Dellman H. Histología Veterinaria. Zaragoza Ed. Acribia, 1980; 529
10. Denissen H. Behavior of calcium phosphate coatings with different chemistries in bones. International J. of Prosthodontics, 1996; 9
11. Dominice JT. An evaluation of electrodischarged prototype implants in rabbits tibia. A preliminary study. J. Oral Implantology. 1994; 20: 299-306
12. Giraldo AE. Caracterización de muestras de coral tratadas con fosfato de amonio por vías hidrotermal y pirotérmica. Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Metalúrgica y de Materiales. Medellín 1997
13. Hashimoto-Uoshima, M. Clinical and Histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. International J. Periodontics Restorative Dentistry. 1995; 15: 205-213.
14. Mora F. Clinical evaluation of natural coral and porous Hydroxylapatite Implants in periodontal bone lesions. J. Clinical Periodontology. 1995; 884-887