

## Injertos óseos - Nueva alternativa. Fase III. Obtención, caracterización y evaluación de Hidroxiapatita Sintética y el compuesto de Hidroxiapatita Sintética porosa – Proteínas Morfogenéticas Óseas en un modelo experimental Lapino

Jairo A Rivera<sup>1</sup>, MVZ, PhD; Carlos H Riaño<sup>1</sup>, MVZ, Esp; Alejandro Echavarría<sup>2</sup>, IM, Ms, PhD; Paula A Monsalve<sup>1</sup>, MV;  
Gildardo J Alzate<sup>1</sup>, MV, Esp; Luis F Restrepo<sup>1</sup>, Est, Esp; Carlos D Jaramillo<sup>1</sup>, MV.

<sup>1</sup> Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias; <sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Metalúrgica y de Materiales  
Universidad de Antioquia, A.A. 1226. Medellín. Colombia. Grupo Biomateriales.  
jairoriveraposada@yahoo.com

(Recibido: 27 mayo, 2003; aceptado: 2 diciembre, 2003)

### Resumen

*El propósito de esta investigación fue obtener Hidroxiapatita (HA) sintética de porosidad inducida con características osteoconductoras y mezclarlas con Proteínas Morfogenéticas Óseas (PMO) de características osteoinductivas, para que actuaran sinérgicamente y formaran un material de injerto biocompatible capaz de inducir la diferenciación de células locales a células formadoras de hueso y al mismo tiempo proporcionar un andamio osteoconductor que dirigiera la formación de nuevo hueso, inmovilizara la molécula inductiva en el sitio de implantación por un tiempo suficiente para influenciar las células de respuesta y actuara como una barrera mecánica inicial para el crecimiento de tejido fibroso o la interposición de músculo en el defecto, para lograr finalmente el crecimiento de nuevo hueso en un tiempo considerablemente reducido y el total reemplazo del injerto por hueso enteramente autólogo. Para evaluar las características de este material, se utilizaron un total de 20 conejos machos raza Blanca de Nueva Zelanda, con un peso promedio de 2.2 kg y 75 días de edad, a los cuales se les creó un defecto óseo de forma rectangular de 8 mm de longitud y de profundidad igual a la corteza, en las diáfisis de las tibias, cara medial. En un miembro se implantaron placas de hidroxiapatita de 8mm de longitud y 2 mm de grosor; en el miembro contrario se implantó el compuesto HA-PMO. Se distribuyeron en 4 grupos de evaluación, a las 3, 6, 9 y 12 semanas de evolución, para valorar las características del implante; se realizó inferencia estadística de los datos tomados en el experimento, con un diseño en parcelas divididas siguiendo como estructura básica de aleatorización un DCA (Diseño Completamente al Azar), aplicando el factor t (tiempo) a las parcelas principales (conejos), y el factor i (tipo de implante) a las subparcelas (miembros posteriores).*

**Palabras clave:** fosfato de calcio, osteoconducción, osteoinducción.

### Introducción

Generalmente se requiere un injerto o un sustituto de hueso para ayudar o completar la reparación de una deficiencia esquelética debida a trauma, tumores o desarrollo anormal, y así restaurar la función normal del tejido (1, 3, 27). Actualmente, los materiales más utilizados son hueso del mismo paciente (hueso autólogo) o hueso de cadáver (hueso alogénico), sin embargo debido a los problemas existentes al utilizarlos, se han realizado investigaciones con diferentes materiales incluyendo biológicos, polímeros, cerámicos y combinaciones de estos (8, 16, 24); tratando de

encontrar el material ideal que los reemplace y elimine los problemas que se presentan al utilizarlos como morbilidad del sitio donador al realizar la cirugía de recolección, limitaciones por disponibilidad, cantidad de hueso autólogo y problemas de rechazo, así como la posibilidad de transmisión de enfermedades al utilizar hueso de cadáver (4, 7, 25).

Dentro de las cerámicas utilizadas se encuentra la HA, que es un mineral encontrado en los huesos y dientes. Existen diferentes formas de obtenerla: a partir

de corales marinos, por calcinación de hueso o sintéticamente (2, 11, 33).

Para la producción sintética de HA, puede suministrarse la fuente de calcio en forma de soluciones acuosas de:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  o  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  y como fuentes de fosfatos pueden emplearse soluciones acuosas de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KHPO}_4$ ,  $\text{N}_2\text{HPO}_4$  o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Rodríguez (22), describió el proceso para producir HA sintética por el método de precipitación continua, a través de la utilización de fosfato de amonio y nitrato de calcio altamente purificados, obteniéndose un material con características microestructurales apropiadas y propiedades osteoconductoras y Since White *et al*, Roy y Linnehan, describieron el método para producir HA porosa, a través de la adición de celulosa antes del proceso térmico (14, 17, 18).

La HA sintética porosa tiene una estructura compuesta por calcio, fósforo e iones hidróxido ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), compatible con los tejidos vivos y tiene una estructura similar al hueso; es estéril, osteoconductor (actúa como un andamio dirigiendo el crecimiento de capilares, tejido perivascular y células desde el hueso y tejidos blandos circundantes hacia el interior del injerto) y posee una excelente osteointegración. La HA se relaciona con el hueso circundante de una manera estrecha y estable tanto química como físicamente, permitiendo así que los procesos de reparación se desarrollen como si se tratara de dos tejidos óseos en estrecho contacto (2, 6, 17).

La seguridad y efectividad de la HA han sido confirmadas en experimentos animales y en un amplio rango de campos clínicos, incluyendo, la cirugía plástica, la cirugía ortopédica, la neurocirugía y la cirugía oral/maxilofacial (14, 18, 33).

Entre las desventajas de la HA se encuentran su débil resistencia mecánica y fragilidad, aunque altos niveles iniciales de resistencia pueden lograrse controlando el grado de porosidad y el grosor del implante, ofreciendo la ventaja de una fijación biológica por crecimiento óseo dentro de los poros interconectados. Aunque se requieren esfuerzos para mejorar la resistencia del material por sí mismo, se cree que la combinación de éste, con alguna sustancia osteoinductora como las proteínas morfogenéticas óseas, es necesaria para mejorar las características

del implante, logrando la regeneración ósea en un tiempo considerablemente reducido (7, 11, 25).

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (PMO) dirigen y regulan los procesos de reparación de fracturas, influenciando la proliferación y diferenciación de las células mesenquimales indiferenciadas en cartílago o en osteoblastos, promoviendo la producción de matriz ósea y la síntesis de proteínas colágenas y no colágenas en el sitio del defecto (10, 12, 28).

Los miembros de la familia PMO (al menos unas 15 moléculas) juegan un papel crítico en la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis de varios tipos celulares, incluyendo los osteoblastos, los condroblastos, las células neuronales y epiteliales. Estas proteínas son péptidos producidos localmente por los osteoblastos y regulados por mecanismos endocrinos, se encuentran distribuidas a lo largo de las fibras colágenas del hueso normal, en células periosteales, y en células mesenquimales de la médula ósea (13, 31, 32).

Se han reportado diferentes métodos de preparación y purificación de PMO; donde se han obtenido PMO parcialmente purificadas de hueso, dentina y osteosarcoma, de diferentes especies: humano, bovino, canino, conejo, rata, entre otras (11, 15, 21). Los resultados sugieren que la actividad de inducción de hueso de las proteínas no es dependiente de especies (7, 21, 23).

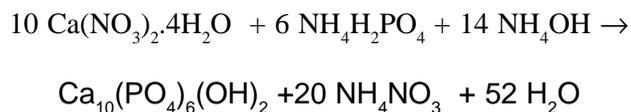
El sustituto óseo ideal debe ser estéril, no tóxico, aceptable inmunológicamente y disponible en cantidades suficientes. El sustituto óptimo debería ser capaz de inducir la diferenciación de células locales a células formadoras de hueso y al mismo tiempo proporcionar un andamio conductor, gradualmente reabsorbible para la formación de nuevo hueso. Adicionalmente, el material debe actuar como una barrera mecánica para el crecimiento de tejido fibroso o la interposición de músculo en el defecto óseo (15, 29, 30).

En este estudio se utilizaron proteínas morfogenéticas óseas que promueven la diferenciación osteoblástica y el crecimiento de nuevo hueso en un tiempo considerablemente reducido, en una matriz de tipo estructural (andamio) osteoconductor como la HA, para lograr finalmente la remodelación total del injerto por hueso enteramente autólogo.

## Materiales y métodos

### *Síntesis y caracterización de HA sintética*

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



Se utilizaron reactivos analíticos y de acuerdo con su peso molecular y pureza se calcularon las cantidades estequiométricas. Para conseguir un total de 20 g de HA, se utilizaron 47.4867g de Nitrato de Calcio pureza 99% y 14.0203g de Fosfato de Amonio monobásico pureza 98%.

*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 de aspas de acero inoxidable cubiertas con resina de poliéster Andercol Cristalán 809™, utilizando recipientes de plástico, con el fin de evitar contaminación metálica, provistos de tapa perforada para evitar contaminación del ambiente. Se disolvieron 47.4867 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  en 1100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para un pH inicial de 5. Seguidamente se adicionaron 125 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para obtener un pH final de 12 y por último se agregó  $\text{H}_2\text{O}$  destilada hasta alcanzar un volumen total de 1800 ml (19).

*Preparación de la solución de Fosfato de Amonio.* Se siguieron los mismos parámetros de agitación que en el procedimiento anterior, se tomaron 14.0203 g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , se diluyeron en 1700 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para un pH inicial de 5. Luego se adicionaron 75 ml de amoníaco ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) para obtener un pH final de 12. Se ajustaron 3000 ml de volumen total con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

*Procedimiento de reacción.* Se adicionó el fosfato de amonio sobre el nitrato de calcio a una rata de 3000 ml/h, por medio de una manguera de caucho, con agitación por 24 horas y seguida de reposo por el mismo tiempo para una decantación del sobrenadante. Posterior a ello se realizaron 4 lavados con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada con agitación durante 18 horas. Al precipitado final obtenido se le determinó el porcentaje de sólidos con base entre el peso en húmedo y en seco. Luego se adicionó, tomando como base el porcentaje de sólidos previamente calculado celulosa ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ ) al 16%, la cual se obtuvo por molienda de papel de filtro

analítico en molino de martillos utilizando malla de cribado de 3 mm y extracción neumática. Finalmente se le hizo una separación sólido-líquido mediante centrifugación.

*Tratamiento térmico.* La HA obtenida fue secada a 120°C durante 2.5 horas y sinterizada a 1050°C durante 2.5 horas, para obtener la porosidad deseada del implante, gracias a la pirolisis y volatilización de las fibras de celulosa en el tratamiento térmico, quedando un poro con un diámetro promedio de 100 micras, proporcionando los espacios tubulares, que son los responsables de una buena oseointegración en el momento del injerto, ya que ayudan a la vascularización del implante y completan la cristalización de la HA. La alta temperatura alcanzada en el proceso, ayuda a descomponer y volatilizar trazas de amonio o nitrato que hayan podido quedar atrapadas en el proceso, además de proporcionar la cristalinidad de la HA.

### *Caracterización de la HA*

*Difracción de Rayos X (DRX).* Su aplicación fundamental, es la identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina. La difracción está basada en las interferencias ópticas que se producen cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación. Se realizó la correlación para identificar por DRX los posibles tipos de fosfatos de calcio, asociados a la HA e identificar esas fases mineralógicas en microfotografías tomadas con luz polarizada. La identificación por DRX se realizó con la correlación de los tres picos principales en el diagrama de la muestra con los estándares internacionales (26) (véanse Figuras 1 y 2).

*Microscopía óptica.* Determinó la distribución porosimétrica y la porosidad total de las muestras obtenidas. Los resultados de los ensayos anteriores se muestran en las figuras 3 y 4.

### *Preparación de los injertos*

Se utilizaron PMO obtenidas en la fase I, a las cuales se les adicionó glicerol para formar un material de consistencia viscosa. El glicerol mejora las propiedades de manipulación, mientras mantiene una osteoinducción estéril del material implantado. La HA fue embebida en una mezcla previa de Glicerol – PMO para lograr que el aire de los poros sea reemplazado por la solución Glicerol-PMO.

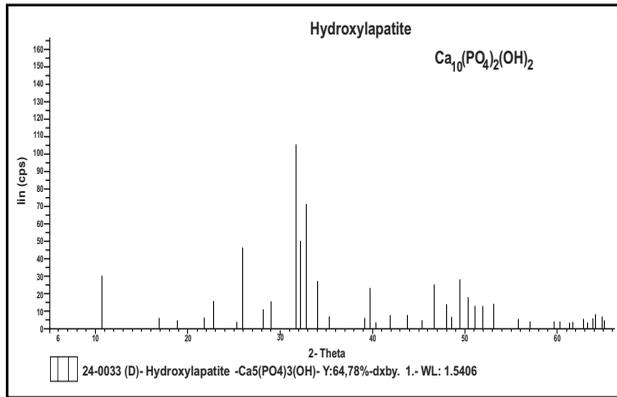


Figura 1. DRX Estándar Internacional Hidroxiapatita.

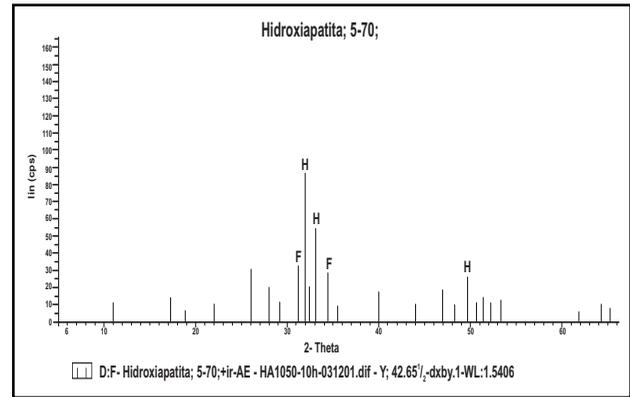


Figura 2. DRX Muestra obtenida (Cerámica bifásica compuesta por HA y fosfato tricálcico).

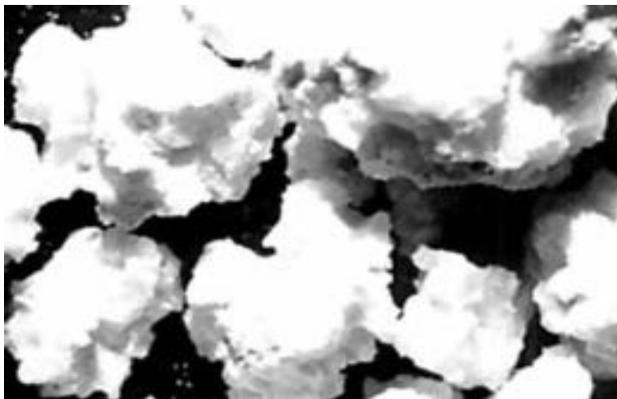


Figura 3. Distribución porosimétrica y porosidad total de las muestras obtenidas (grado de porosidad 16%).

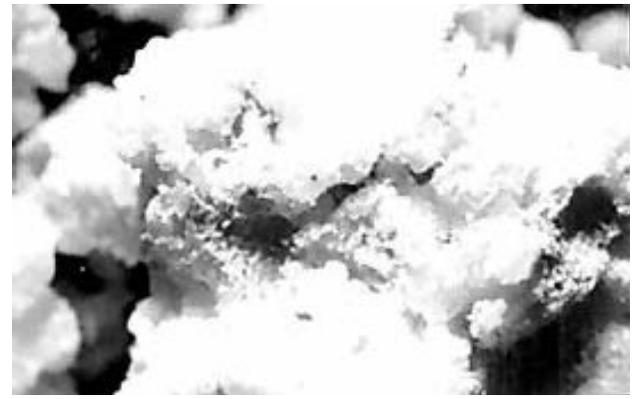


Figura 4. Detalle foto anterior.

### *Selección grupo de animales*

Se utilizó el protocolo experimental F 981-93 de ASTM (American Society for Testing and Materials, organización americana encargada del desarrollo de estándares internacionales de materiales, productos, sistemas y servicios) para evaluar la reacción de los tejidos a biomateriales utilizados en injertos quirúrgicos. Se trabajó con un número total de 20 conejos machos, raza blanca Nueva Zelanda de 75 días de edad y 2.2 kg peso promedio. Se distribuyeron en 4 grupos de evaluación de 5 animales cada uno y se realizaron biopsias a las 3, 6, 9 y 12 semanas de evolución, para valorar las características del implante.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones similares de alimentación y a una temperatura 22°C.

### *Procedimiento quirúrgico*

Los individuos fueron preparados para intervención quirúrgica previa depilación y lavado de la zona con

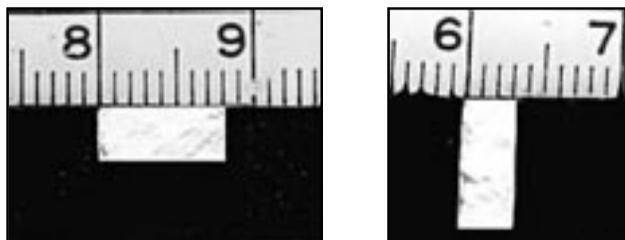
gluconato de clorhexidina al 0.2%, y posteriormente con alcohol isopropílico al 70%, anestesiados mediante inyección intramuscular de ketamina (Ketaset®, Parke-Davis Laboratories) a una dosis terapéutica de 20 mg/kg.

Se les creó un defecto óseo de forma rectangular de 8 mm de diámetro y de profundidad igual a la corteza, en las diáfisis de las tibias, cara medial, utilizando microsierra oscilante.

En un miembro se implantaron placas de HA de 8 mm de diámetro y 3 mm de grosor; en el miembro contrario se implantó el compuesto HA-PMO (véase Figura 5). El injerto fue colocado por presión digital y con la cautela necesaria para impedir su movimiento en los tejidos, asegurado con sutura perióstica.

En el postoperatorio se utilizó una terapia antibiótica de cefalosporina de primera generación, Cefaloridina,

a una dosis terapéutica de 15 mg/kg cada 12 horas, con limpieza y desinfección del área quirúrgica diariamente, hasta que la cicatrización superficial fue completa (promedio 10 días). Se procedió a realizar eutanasia a 5 animales de cada grupo, mediante sobredosis de pentotal sódico con el fin de tomar las muestras para evaluación histopatológica.



**Figura 5.** Dimensiones bloques de HA implantados (8 mm de diámetro y 3 mm de espesor)

### *Evaluación clínica*

Se evaluaron los siguientes parámetros al examen clínico diario: aumento de la temperatura, edema, dolor, cojera, limitación funcional, desplazamiento y toma de alimento. Los animales que murieron antes de la fecha esperada se examinaron para determinar la causa de su muerte y eliminarlos o incluirlos en la prueba.

### *Evaluación histológica*

Ambas tibias fueron disecadas y fijadas en formalina buferada al 10% y  $\text{CaCl}_2$  como fijador. Los cortes histológicos fueron teñidos por el método de hematoxilina-eosina (24).

En la descripción microscópica se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

1. Inflamación: tipo de células, tejido conjuntivo fibroso: fibroblastos y fibroblastos.
2. Formación ósea: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, trabéculas, láminas óseas.

### **Análisis estadístico**

Se realizó inferencia estadística a los datos tomados en el experimento, con un diseño en parcelas divididas, aplicando el factor t (tiempo) a las parcelas principales (conejos) y el factor i (tipo de implante) a las subparcelas (miembros posteriores).

El procedimiento “Modelo Lineal General” (GLM) del S.A.S. 8.0 (Statistical Analysis Software) arrojó el análisis de varianza del experimento para evitar trabajar únicamente con el error producido por las subunidades (material de injerto utilizado: HA, HA-PMO), se eligió el reconocimiento del modelo mixto (*Test of Hypotheses for Mixed Model Analysis of Variance*) el cual evaluó con el error de las unidades principales y de las subunidades haciendo del análisis de varianza el más adecuado para el modelo. También se hizo la prueba de rangos múltiples de Duncan en caso de que la diferencia resultara significativa, donde se compararon las distancias entre los promedios muestrales contra la amplitud límite de significancia, y se hicieron comparaciones de efectos promedios entre los tratamientos.

Antes de hacer el análisis de varianza se realizó transformación logarítmica con el fin de convalidar los supuestos asociados con el diseño de clasificación experimental a los siguientes datos: fibroblastos, macrófagos, células gigantes, osteoclastos, osteoblastos, y trabéculas. A las láminas se les realizó una transformación angular. La transformación de los datos se logró a través de los procedimientos GLM y MEANS del S.A.S. 8.0. El nivel de significancia es de  $p < 0.05$ .

### **Resultados**

Se obtuvo una cerámica bifásica compuesta por HA y Fosfato tricálcico (TCP), con una relación final Ca/P inferior a 1.67 y un grado de porosidad de 16%. (véase Figura 2).

No hubo morbilidad o mortalidad de los animales a lo largo del estudio. No se observó infección o movimiento de los implantes.

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los implantes, al describir las variables medidas (véase Tabla 1).

### **Discusión**

Se obtuvo una cerámica bifásica compuesta por HA y TCP, con una relación final Ca/P inferior a 1.67. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Riaño y Echavarría (5, 9, 20) en los cuales se obtuvo HA sintética no reabsorbible sin TCP, con relaciones Ca/P superiores o iguales a 1.67, sugiere

que se deben tener en cuenta otros factores determinantes en el proceso de obtención de HA sintética porosa como la temperatura de sinterización, la cual según los mismos autores, se relaciona directamente con el grado de cristalinidad del implante obteniéndose HA reabsorbible a temperaturas bajas

(600 - 900°C) e HA no absorbible a temperaturas superiores a los 1050°C. El porcentaje de absorción del implante está relacionado además con la relación Ca/P, debido a que ésta fue menor a 1.67 y se espera que el implante tenga un pequeño porcentaje de reabsorción.

**Tabla 1.** Resultados del análisis histomorfométrico y estadístico.

Tipo de célula	Tiempo (semanas)	Implante HA	Implante HA-PMO	Total	Análisis Estadístico
Fibroblastos	3	24	35	59	
Tiempo (p < 0.1717)	6	11	9	20	No hubo diferencia significativa.
	9	14	22	36	
	12	9	13	22	
Macrófagos	3	4	2	6	Hubo diferencias significativas, tanto en tiempo como en implante
Tiempo (p < 0.0041)	6	0	0	0	
Implante (p < 0.0432)	9	5	1	6	
	12	4	5	9	
Células gigantes	3	3	4	7	No hubo diferencia significativa
Tiempo (p < 0.7147)	6	3	3	6	
	9	6	3	9	
	12	5	5	10	
Osteoclastos	3	8	7	15	Hubo diferencia significativa en tiempo, mas no en el tipo de implante
Tiempo (p < 0.0045)	6	4	5	9	
Implante (p < 0.2832)}	9	4	3	7	
	12	3	2	5	
Osteoblastos	3	17	33	50	No hubo diferencia significativa
Tiempo (p < 0.682)	6	19	26	45	
	9	15	19	34	
	12	17	19	36	
Trabéculas	3	79%	92%		Hubo diferencia significativa en tiempo, mas no en el tipo de implante
Tiempo (p < 0.0001)	6	2%	1%		
Implante (p < 0.2857)	9	0%	7%		
	12	0%	0%		
Láminas	3	8%	21%		Hubo diferencia significativa en tiempo, mas no en el tipo de implante
Tiempo (p < 0.0001)	6	78%	96%		
Implante (p < 0.1654)	9	93%	100%		
	12	100%	100%		

Esta tabla resume los resultados de los análisis histomorfométrico (Número de células por campo 40X) y estadístico, obtenidos después de la implantación de bloques de HA y bloques del compuesto HA-PMO.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre tipo de implante (HA, HA-PMO). Según Takaoka (25), los discos de HA porosa no son cargadores adecuados para las PMO, ya que en su investigación, el compuesto HAP- PMO no permitió la formación ectópica de hueso, sin embargo ésta se produjo constantemente durante 4 semanas al usar un cargador reabsorbible como el colágeno. El hueso ectópico se formó usualmente en lugares donde el agente inductor de hueso fue reabsorbido o

biodegradado por el tejido del huésped. Esto, puede significar que la degradación del cargador de las PMO es esencial para la inducción de hueso, además la estructura porosa de la HA, pudo haber facilitado la rápida difusión y pérdida de la fracción PMO del implante, impidiendo su acción.

Breitbart (4) reporta que cuando se combinan PMO con HA reabsorbible y no reabsorbible y se implanta intramuscularmente, se presenta osteoinducción en los

implantes no reabsorbibles, pero al ser implantado en defectos óseos, se presenta osteoinducción en ambos tipos de implantes. Aunque aseguran que la HA no reabsorbible permanece esencialmente como un cuerpo extraño, siendo incorporada dentro del hueso circundante, sin ser reemplazada por hueso. Por lo tanto un material osteoconductor reabsorbible, puede ser de hecho más efectivo como cargador de proteínas osteogénicas, ya que el uso de un implante reabsorbible en directo contacto con el hueso, proporciona un ambiente para el crecimiento óseo que no existe en sitios ectópicos.

Según Breitbart (4) los osteoclastos fueron evidentes en los sitios de resorción del fosfato tricálcico, de hecho la fagocitosis osteoclástica pareció ser el mecanismo primario de resorción del implante en este modelo. Es probable que la cascada de eventos iniciados por las PMO que permiten la diferenciación de hueso, también incluyan una simultánea proliferación de osteoclastos, causando resorción del fosfato tricálcico.

Debido a que las proteínas utilizadas fueron parcialmente purificadas, los elementos adicionales pudieron haber actuado como cargadores y haber facilitado la inducción ósea, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la fase dos de la presente investigación (se observó osteoinducción al implantar las PMO en sitios ectópicos). Se recomienda la utilización de PMO más purificadas o en mayor cantidad para asegurar que la cantidad de PMO sea suficiente para inducir la formación de hueso.

Debido a que las proteínas implantadas inician su expresión desde la fase aguda del hematoma (23, 31, 32), presentándose la máxima expresión de las proteínas en los días 7-14 cuando se completa la condrogénesis (3, 21, 23). Se recomienda para futuras investigaciones disminuir los tiempos de evaluación y los intervalos entre estos, ya que en la presente investigación se tomaron las primeras muestras a las 3 semanas con intervalos de 21 días, lo que conlleva a perder información acerca de la diferenciación celular mediada por las proteínas. Se debe tener en cuenta que para evaluar el incremento de la cantidad de hueso formado, es necesario prolongar el tiempo de evaluación por un período mínimo de 6 meses, ya que el hueso alcanza el 100% de su mineralización aproximadamente en un año (4, 13, 15).

El hallazgo de un mayor número de fibroblastos, osteoblastos y trabéculas a la semana tres, y láminas a la semana 12 concuerda con lo descrito en la literatura (24), ya que la mayor actividad celular se observa en las etapas iniciales de la regeneración ósea, también y aunque las diferencias no fueron significativas, se presentó un mayor número de células (fibroblastos, osteoblastos y trabéculas) en el implante HA-PMO en comparación con el implante HA, lo que sugiere una mayor actividad osteoinductiva en el implante HA-PMO, debido a que las proteínas estimulan la diferenciación celular en las etapas iniciales de la regeneración.

### Agradecimientos

Dra. Yamile Acosta, Directora Centro de Servicios de Salud, SENA, Dra. Marta Quintero Directora Centro Agropecuario La Salada, SENA, Dr. Augusto González MV y Neila Moreno. Centro Agropecuario La Salada, SENA, Dra. Gloria Giraldo, Laboratorio de Patología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Dra. Ángela Restrepo, Dra. Mirtha Arango. Corporación de Investigaciones Biológicas -CIB-

### Summary

*Osseous graft-New alternative. Phase III. Obtainment, characterization and evaluation of Synthetic Hydroxyapatite and a Porous Synthetic Hydroxyapatite and Bone Morphogenetic Protein Composite in a lapine experimental model.*

*The purpose of this research was to obtain synthetic Hydroxyapatite (HA) of induced porosity with osteoconductive characteristics and to mix it with Bone Morphogenetic Proteins (BMP) of osteoinductive characteristics, so they would act synergically and would form a biocompatible graft material, able to induce differentiation of local cells to bone forming cells and at the same*

*time supply an osteoconductive framework that lead to new bone formation, immobilize the inductive molecule at the implantation site for a sufficient time to influence the responding cells and would act as a mechanic initial barrier for fibrous tissue ingrowth or muscle interposition in the defect, thus finally achieve new bone formation in a substantial reduced time and graft total replacement by completely autologous bone. To evaluate the characteristics of this material, a total of 20 male New Zealand rabbits with an average weight of 2.2 kg and 75 days of age were used, a rectangular osseous defect of 8 mm of diameter with equal depth at the cortex was created in the medial face of the tibia diaphysis. In a hind limb, hydroxyapatite plates of 8 mm of large and 2 mm of thickness were implanted; in the opposite hind limb the compound HA-PMO was implanted. The rabbits were distributed in 4 evaluation groups at 3, 6, 9 and 12 weeks of evolution, to evaluate the characteristics of the implant. Statistical inference of the data taken on the experiment was performed, with divided parcels design, following as basic structure of aleatorization a Completely Random Design (CRD), applying t factor (time) to main parcels (rabbits), and i factor (graft material) to subparcels (posterior limbs).*

**Key Words:** *calcium phosphate, osteoconduction, osteoinduction.*

## Referencias

1. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a Review. *Br J Oral Maxillofacial Surg*, 1995; 33:312-318.
2. Ayers R, Simske S, Nunes C, Wolford L. Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. *J Oral Maxillofacial Surg*, 1998; 56: 297-1301.
3. Bostrom MP. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop*, 1998; 335:(S) 116-123.
4. Breitbart AS, Staffenberg D, Thorne C, Glat P, Cuningham N, et al. Tricalcium phosphate and osteogenin: a bioactive onlay bone graft substitute. *Plastic and Reconstructive Surg*. 1995; 96(3): 699 - 707.
5. Cardona JJ. Obtención y caracterización de hidroxiapatita sintética. Proyecto de Grado, Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Medellín, 1997; 68 p.
6. Cornell C, Lane JM. Newest factors in fracture healing. *Clinical Orthop and Related Research*. 1992; 277:297 – 311.
7. Damien C, Parson R, Prewett B, Huismans F, Venazio M, et al. A coralline hydroxyapatite and demineralized bone matrix gel composite for bone grafting. Excerpted. Fourth world biomaterials congress. Berlin, Federal Republic, 1992.
8. Fitch R. Bone autografts and allografts in dogs. *Compendium on continuing education* 1997; 19(5): 558-573.
9. Giraldo AE. Caracterización de muestras de coral tratadas con fosfato de amonio por vías hidrotermal y pirotérmica. Proyecto de grado, Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, Medellín, 1997; 407 p.
10. Hanamura H, Higuchi Y, Nakagawa M, Iwata H, Nogami H, et al. Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix. *Clinical Orthop and Related Research*. 1980; 148: 281-290.
11. Hemmerlé J, Cuisinier G, Schultz P, Voegel C. HRTEM Study of biological crystal growth mechanisms in the vicinity of implanted synthetic hydroxyapatite crystals. *J Dental Research*. 1997; 76(2):682-687.
12. Jeffers SR. Bone graft material for osseous defects and method of making same. United States Patent, N° 4394370, July 9, 1983. URL: <http://www.ustp.gov/>.
13. Khouri RK, Brown D, Kouksi B, Deune G, Gilula L, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plastic and Reconstructive Surg*. 1996; 98(1):103 - 109.
14. Kitsugi T, Yamamuro T, Takeuchi H, Ono M. Bonding behavior of three types of hydroxyapatite with different sintering temperatures implanted in bone. *Clinical Orthop and Related Research*. 1988; 234:280-290.
15. Linkhart TA. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF-b and BMP. *Bone*. 1998; 19(6):591 – 603.

16. Mc. Laughlin RM. Autogenous cancellous and corticocancellous bone grafting; Symposium Fracture Management: 1. Vet Med. 1993; 12(98): 1063-1080
17. Mik T, Imai Y. Osteoinductive potencial of freezed - dried, biodegradable, poly (glicolic acid - colactic acid) disks incorporated with bone morphogenetic protein in skull defects of rats. Int J Oral and Maxilofacial Surgery, 1996; 25: 402 – 406.
18. Ono Ichiro, Tateshita T, Satou M, Sasaki T, Matsumoto M, et al. Treatment of large complex cranial bone defects by using hydroxyapatite ceramic implants. Plastic and Reconstructive Surgery. 1999; 104(2): 339-349.
19. Riaño C, Echevarría A, Ramírez G, Escobar I, Cardona J, et al. Características osteoconductoras de la hidroxiapatita sintética y la derivada de corales marinos injertadas en conejos. Análisis descriptivo. Rev. Col. Cienc. Pec. 1999; 12: 97 – 107.
20. Riaño C, Echevarría A, Noreña A. Hidroxiapatita sintética de porosidad inducida-comparación con el hueso calcinado. Rev Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia, 1999; 19: 56 – 64.
21. Ripamonti U, Duncas N. Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. Plastic and reconstructive surgery. 1998; 227-235.
22. Rodríguez R, Gómez J, Torrent J, Boix T, Fraile J. Precipitation of stoichiometric hydroxyapatite by a continuous method. Cryst Res Technol. 2001; 36(1): 15-26.
23. Sakau T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone, 1998; 22(6): 591 – 603.
24. Stenberg S. Histology for pathologists. 2da.ed, New York, Raven Philadelphia. 1997. Chapter 5: 85 -104.
25. Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Ectopic bone induction in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. Clinical Orthop and Related Research. 1988; 234: 250 - 254.
26. Teraoka K, Ito A, Maekawa K, Onuma K, Tateishi T, et al. Mechanical properties of hydroxyapatite and OH-Carbonated hydroxyapatite single crystals. J Dent Res. 1998; 77(7): 1560 - 1568.
27. Urist MR, Lietze A, Mizutani H, Katsumatsa T, Triffit T, et al. Bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. Clinical Orthop and Related Research. 1982; 162: 219 – 232.
28. Urist MR. Bone morphogenetic agents. United States Patent N° 4795804, January 3, 1989. URL: <http://www.ustp.gov/>.
29. Viljanen VV, Lindholm TS. Comparision of native xenogenic and allogenic bone morphogenetic proteins in the sheep skull defect assay model. Ann Chir Gynaecol 1997; 86(3): 255 - 9.
30. Wang EA, Rosen V. Purification and characterization (Biochemistry) of other distinct bone - inducing factors. Proc Natl Acad Sci. 1988; 85: 9484 – 9488.
31. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and Bbone morphogenetic protein gene family in bone formation and Repair. Clin Orthop 1998; 346: 26 – 37.
32. Wozney MJ. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. J Periodontol 1995; 66(6): 506-509.
33. Yoshida K. Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study. J Cranio-Maxillofacial Surg. 1998; 26(2): 112-5.