

Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana

Facultad de Estomatología

**EVALUACION ANATOMOPATOLOGICA EXPERIMENTAL DE LA
IMPLANTACION EN HUESO**

DE LA HIDROXIAPATITA SINTETICA (APAFILL-G)

*Dr. Rafael Delgado Fernández. Domínguez Núm. 212 e/ Santa Catalina y Calzada del Cerro. Teléfono: 832-9914. vicedinve@infomed.sld.cu

**Dr. Joaquín Urbizo Vélez. Calle San Pablo Núm. 407 altos e/ Clavel y Mariano. Cerro. Teléfono: 873-8706. joaquin.urbizo@infomed.sld.cu

***Dr. Víctor Rodríguez Sosa. Ave. 146 y 31. Cubanacán. Playa. Ciudad de La Habana. vmrs@giron.sld.cu

****Dr. Raúl García Carrodegua. Ave. Universidad e/ Ronda y Calle G. Ciudad de La Habana.

*****Dra. Zaida Cabaleiro Pelayo. Humboldt Núm. 159 Apto. 17 e/ O y P. El Vedado.

*****ATD. Enrique Iglesias Rodríguez. Calle 240 Núm. 526. Jaimanitas

*****MSc. Miriam Ríos Hernández. Calle 4 Núm. 455 e/ 19 y 21. El Vedado.

* Especialista Segundo Grado en Anatomía Patológica. Profesor Auxiliar.

** Especialista Segundo Grado en Anatomía Patológica. Profesor Titular.

*** Médico Veterinario. Centro de Cirugía Experimental. ICBPC-Victoria de Girón.

****DrCQ. Centro de Biomateriales. Universidad de La Habana.

***** Estomatóloga. Profesora Auxiliar Radiología.

***** Técnico Auxiliar Docencia Anatomía Patológica.

***** Centro de Control Estatal Equipos Médicos del MINSAP.

RESUMEN

Es bien conocido en el mundo el uso de la hidroxiapatita como material de implante para la restauración de defectos óseos. El presente estudio experimental tuvo como objetivo determinar la histocompatibilidad y las propiedades de osteoconducción y biodegradación del APAFILL-G: hidroxiapatita sintética obtenida por el método de ceramización, desarrollada por el Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana. Para esta experiencia, se emplearon 10 perros *Beagle*, a los cuales se les realizaron implantes de APAFILL-G en fémur y mandíbula, con sus correspondientes controles; fueron sacrificados a los tres y seis meses y al año y dos años de implantados; se obtuvieron muestras de tejido del área de implantación que fueron fijadas en formol neutro y procesadas, previa descalcificación, por el método de inclusión en Parafina y coloreadas con Hematoxilina y Eosina. El estudio se realizó con microscopio óptico. Los resultados permitieron determinar que el APAFILL-G resultó ser histocompatible, osteoconductor y no se observaron signos de biodegradación en ninguna de las muestras en los diferentes períodos estudiados. Estos resultados corroboran los estudios realizados por otros autores en el mundo.

Palabras clave: Hidroxiapatita, Toxicidad, Implante.

INTRODUCCION

Las cerámicas de fosfato de calcio han sido utilizadas como materiales de implantes en tejido óseo desde hace aproximadamente 30 años. De estos materiales, uno de los más estudiados ha sido la hidroxiapatita (HA).

El interés por el uso de estas sustancias es bien simple: la hidroxiapatita es el componente mayoritario de la parte mineral del tejido óseo y dental, por lo cual es de esperar que materiales preparados a partir de esta sustancia fuesen más biocompatibles al ser implantados en hueso que el resto de los ensayados hasta entonces. Los rasgos genéricos de la acción biológica de estos materiales al ser implantados, han sido descritos en el mundo: 1) Carencia de toxicidad local o sistémica; 2) Carencia de respuesta inflamatoria o de cuerpo extraño; 3) Ausencia de tejido fibroso entre el implante y el hueso y 4) Capacidad de enlazarse directamente al tejido óseo viviente mediante mecanismos naturales de cementación ósea.

El empleo de granulados de hidroxiapatita como material de relleno de defectos y cavidades óseas, se ha extendido en especialidades como Estomatología, Cirugía y Ortopedia.

En Estomatología, se ha reportado su uso clínico en la elevación y mantenimiento del reborde alveolar, tratamiento de defectos óseos periodontales, colocación de implantes intraóseos, relleno de cavidades quísticas y recubrimientos pulpares 2, 3 .

En Cirugía cráneo-facial, se han usado exitosamente los granulados de HA en el relleno de defectos quísticos, siendo también ésta la aplicación principal que han encontrado en el campo de la Cirugía Ortopédica y Oncológica; 4 últimamente, ha tenido interés su aplicación en la estabilización de implantes ortopédicos intra-medulares.

El Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana acometió la tarea de desarrollar, evaluar, producir y registrar biomateriales cerámicos basados en hidroxiapatita, obtenidos por métodos de síntesis química por vía húmeda y ceramización. Uno de los materiales desarrollados en esta línea es el Apafill-G: granulado denso de HA, diseñado para el relleno de defectos óseos.

Este material ha sido estudiado desde el punto de vista de su composición química y propiedades físicas; se ha demostrado su similitud con otros materiales comercializados por distintas firmas extranjeras.

Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que el Apafill-G no provoca reacción tóxica alguna en los niveles celular y sanguíneo. 5

El presente estudio tiene el propósito de demostrar la respuesta hística, atendiendo a la osteoconducción, biocompatibilidad, bioestabilidad, así como la toxicidad *in vivo* del Apafill-G, en diferentes períodos de tiempo, mediante su implantación en hueso, en animales de experimentación. Los resultados de esta evaluación posibilitarán iniciar los correspondientes ensayos clínicos, establecidos en las normas internacionales, de modo que permitan obtener el registro correspondiente para su generalización.

MATERIAL Y METODO

Para el desarrollo de este estudio, se utilizó el método que establece la norma internacional ISO 10993-6. 6

Se emplearon 10 perros *Beagle* machos sanos, con una masa corporal entre 10 y 12 kg. Todos los animales fueron sometidos, como mínimo, a un período de adaptación de 7 días antes de la implantación, y su estado de salud fue controlado por un médico especialista en Medicina Veterinaria.

El material de prueba fue identificado con un número clave, cuyo significado sólo lo conocía el coordinador del ensayo.

La cantidad total de animales de ensayo empleados fue de 10, distribuidos por períodos de implantación de acuerdo con la Tabla 1.

La implantación del material de prueba se realizó en tres sesiones quirúrgicas:

1 Se implantaron animales para ser evaluados a las 104 semanas (4 animales).

2 Se implantaron los animales para la evaluación en los períodos correspondientes a las 52 y 26 semanas (4 animales).

3 Se implantaron los correspondientes al período de evaluación de 12 semanas (2 animales).

Cada animal se implantó en fémur y en mandíbula; un sitio por cada fémur y uno por cada lado en la mandíbula, para un total de dos sitios en fémur y dos en mandíbula por animal.

En el procedimiento de implantación, se les administraron a los animales 30 mg/kg de pentobarbital sódico como anestésico y 1,200, 000 U.I de penicilina por vía intramuscular, inmediatamente después de ser anestesiados.

Mediante disección anatómica de la zona, se abordó el tercio medio del fémur, y se crearon dos cavidades de 3 mm de diámetro en la corteza lateral, en dirección transversal al eje longitudinal del hueso hasta la zona medular, pero sin dañar ésta; se dejó una separación de 20 mm entre ellas. Para esto, se empleó una fresa de 3 mm de diámetro, aplicando irrigación abundante con suero fisiológico. Se rellenó una de las cavidades con el material de prueba correspondiente. En la segunda cavidad, tanto en el fémur como después en la mandíbula, el proceder fue el mismo, con la única excepción de que no se colocó ningún implante, y se tomó como referencia (sitio control), para determinar la capacidad de respuesta reparativa natural del tejido óseo del animal en los distintos períodos de implantación.

Al concluir la implantación, se colocó nuevamente el periostio en su posición, se afrontaron los planos musculares y se suturó la piel.

El procedimiento de implantación en la mandíbula fue similar al desarrollado en el fémur.

Al finalizar cada período de portar el implante, los animales fueron anestesiados y, seguidamente, fueron intervenidos quirúrgicamente y se extrajeron los bloques de hueso implantados, los que se fijaron en formol neutro a 10% y se identificaron respectivamente con las claves del animal, del sitio y el período.

Al concluir la última extracción, se sacrificó el animal con una sobredosis de anestesia.

Los especímenes obtenidos se estudiaron macroscópicamente y las piezas seleccionadas fueron sometidas a un proceso de descalcificación mediante una solución de ácido fórmico-citrato de sodio. Se aplicó el método de inclusión en parafina y, seguidamente, se hicieron cortes seriados en un micrótopo horizontal. Se seleccionaron para el estudio, los cortes alternos 1,3,5,7 y 9. Las láminas obtenidas fueron coloreadas con Hematoxilina y Eosina. Las observaciones histomorfológicas se realizaron por un solo especialista, empleando un microscopio binocular de luz. Para determinar la posible reacción tóxica local, se observó si hubo presencia de infiltrado inflamatorio en el tejido vecino al material implantado, y las características de la misma, además, la presencia o ausencia de necrosis (Leyenda).

Para la determinación de las propiedades osteoconductoras y de histo-compatibilidad, se observó si hubo crecimiento del hueso entre los gránulos del material en contacto directo con el mismo, y cubriendo el defecto. Además, se observó la presencia o ausencia de tejido fibroso entre el implante y el hueso vecino.

Para determinar la bioestabilidad, se observó si hubo o no degradación del material en las zonas de crecimiento óseo.

En relación con los sitios control, se observaron las características de la reparación natural del defecto óseo en cada período.

RESULTADOS

Este estudio histopatológico permitió determinar la toxicidad local de las muestras de ensayo del material, así como la capacidad de la respuesta hística reparativa de los sitios control de cada animal en los respectivos períodos de tiempo. Estos resultados aparecen resumidos en las tablas 1 y 2, en las que se registran las evaluaciones cuantitativas y cualitativas, según el método empleado.

Los principales hallazgos microscópicos observados en los sitios de implantación y en los de control en los períodos establecidos, son los siguientes:

En los sitios control, a las 12 semanas, se observó formación de tejido óseo cubriendo parcialmente el defecto, quedando algunas áreas de tejido fibroso cubriendo la cavidad. En el resto de los períodos, la reparación ósea de los defectos fue casi total, lo que evidenció la capacidad de respuesta reparativa de los animales. No obstante, la reparación en estos sitios fue más lenta que en los implantados. En ninguno de ellos, se observó respuesta inflamatoria ni de otro tipo que evidenciara anormalidad en la reparación (Tabla 2).

Debido a que las características histopatológicas alrededor de los implantes a las 12 semanas fueron muy semejantes a las del período de 26 semanas, las describiremos en conjunto.

En el hueso mandibular, en los sitios de implantes, se observó en las áreas más superficiales o corticales la formación de hueso joven alrededor de los espacios ocupados por los gránulos del implante, e íntimamente relacionados con los mismos; no se observaron elementos microscópicos de respuesta inflamatoria ni de rechazo en los sitios implantados. Por su parte, el fémur presentó proliferación de tejido óseo rodeando los espacios ocupados por el material, existiendo continuidad de la cortical a dicho nivel, aquí tampoco se observaron evidencias de reacciones hísticas adversas.

Los resultados a las 52 y 104 semanas de implantación, por presentar características similares entre sí, también serán descritos en conjunto.

Tanto en el fémur como en la mandíbula, donde se implantó el Apafill-G se observó tejido óseo con mayor grado de madurez rodeando los espacios que ocupaba el material, principalmente en los implantes de dos años. No se observaron elementos hísticos de rechazo en el tejido vecino.

En ninguno de los sitios donde se implantó el Apafill-G se observó biodegradación del material (Tabla 1).

DISCUSION

En la literatura revisada, hemos podido apreciar numerosos estudios, tanto preclínicos como clínicos, sobre el uso de la (HA) como material de implantación ósea en diferentes afecciones de los maxilares y la mandíbula, y los resultados han sido por lo general satisfactorios. En nuestro estudio sobre el Apafill-G, podemos plantear que se presentó como un material histocompatible y osteoconductor, por no presentar respuesta inflamatoria ni de rechazo, facilitando el crecimiento del tejido óseo entre los gránulos del material, lo que está en correspondencia con lo planteado por otros autores en la literatura revisada, donde aparecen demostradas estas propiedades en estudios preclínicos. 7-9 Por otra parte, resultados similares se han encontrado en estudios clínicos hechos sobre implantes metálicos recubiertos por HA, 10, 11 así como reconstrucción y levantamiento de rebordes alveolares y pisos de senos maxilares. 12-15

El período de mayor consolidación ósea se observó a partir de las 52 semanas, coincidiendo con los resultados de Rungcharassaeng y col., 16 donde todos los implantes colocados presentaron muy buena consolidación ósea. Una característica que siempre estuvo presente en todos los implantes de Apafill-G fue su bioestabilidad, al menos hasta las 104 semanas de realizados; esta característica puede ser debida al alto contenido de calcio de la HA.

Como es conocido, los osteoclastos puede atacar la superficie del implante; sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos actividad osteoclástica en ninguno de los sitios de implantes estudiados. El Apafill-G prácticamente no mostró biodegradación; esto coincide con los resultados de otros autores como Le Geros y col. 17 Según la revisión hecha, el mecanismo de biodegradación no está claro; en sentido general se plantea que el medio ácido disuelve el Beta Fosfato Tricálcico *in situ*. 18

Se pudo apreciar que en los sitios control, donde las cavidades no tenían ningún material, la osificación total del defecto se demoró más que en los sitios implantados.

Los resultados de este estudio evidenciaron que el Apafill-G se presentó como un material histocompatible y osteoconductor, que posibilitaba la proliferación de tejido óseo en cavidades previamente hechas en el fémur y la mandíbula; estas propiedades hacen que las grandes cavidades óseas, resultantes de extirpaciones quirúrgicas por tumores o quistes, se puedan reparar con más rapidez que si se dejan sin rellenar, reparándose por la vía natural sin otro tipo de soporte. Además, no se observó respuesta hística desfavorable que indicara rechazo a los implantes.

Todos estos elementos nos permiten inferir que el Apafill-G se puede valorar como no tóxico localmente, no provocando inflamación o respuesta a cuerpo extraño en el tejido, lo cual posibilita su valoración para futuros ensayos clínicos en pacientes y, posteriormente, la generalización del uso de este producto cubano, de gran utilidad en las prácticas médica y estomatológica en general.

CONCLUSIONES

En este estudio se comprobó que el Apafill-G presenta las siguientes características:

- Es histocompatible y osteoconductor cuando se utiliza en el relleno de defectos óseos.
- Es no tóxico localmente, al no causar respuesta hística desfavorable después de ser implantado en el hueso mandibular y en el fémur.
- Es bioestable.

ABSTRACT: Experimental study of the installation of the synthetic hidroxiapatita (APAFILL-G)

It is very well-known in the world the use of the hidroxiapatita like material useful for implants in the restoration of bony defects. The present experimental study had as objective to determine the histocompatibility and the osteoconduction properties and biodegradation of the APAFILL-G: synthetic hidroxiapatita obtained by the ceramization method, developed by the Center of Biomaterials of the University of Havana . For this experience, 10 dogs Beagle was used, to which were carried out you implant of APAFILL-G in femur and jaw, with their run-pondientes controls; they were sacrificed to the three six months and the year and two years of having implanted; samples of fabric of the installation area were obtained that were fixed in formol neuter and processed, previous decalcification, for the inclusion method in Paraffin and colored with Hematoxilina and Eosina. The study was carried out with optic microscope. The results allowed to determine that the APAFILL-G turned out to be histocompatible, osteoconductor and biodegradation signs were not observed in none of the samples in the different studied periods. These results corroborate the studies carried out by other authors in the world.

Words key: Hidroxiapatita, Toxicity, Implant.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1 Jarcho M. Biomaterials aspects of calcium phosphate. Properties and applications. Dent Clinics North Am. 1986; 30 (1): 25-47.

2 Froum S, Cho SC, Elian N, Rosemberg E, Rohrer M, Tarnow D. Extraction sockets and implantation of hydroxiapatites with membrane barriers: a histologic study. Implant Dent 2004 Jun; 13 (2): 153-64.

3 Okuda K, Tai H, Tanabe K, Susuki H, Sato T, Kawase T, Saito Y, Wolff LF, Yoshiex H. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxiapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in human: a comparative controlled clinical study. J Periodontol 2005 Jun; 76 (6): 890-8.

- 4 Ogose A, Hotta T, Kamashima H, Kondo N, Gu W, Kamura T, Endo N. Comparison of hydroxiapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005 Jan 15;72(1):94-101.
- 5 Rios M, Cepero J, González A, Perz K, Bello J L. Ensayo de citotoxicidad in vitro como método alternativo para la evaluación toxicológica preclínica de biomateriales y equipos médicos implantables. *Revista Hispanoamericana de Animales de Experimentación* 1999; 4 (4): 28-34.
- 6 ISO CD 10993-6. Biological testing of medical and dental materials and devices. Part 6: Test for local effects after implantation, 1991.
- 7 Verheggen R, Merten HA. Correction of skull defects using hydroxiapatite cement (HAC)—evidence derived from animal experiments and clinical experience. *Acta Neurochir (Wien)*. 2001 Sep;143(9):919-26.
- 8 Honig JF, Merten HA, Nitsch A, Verheggen R. Contouring of cranial vault irregularities with hydroxiapatite cement: a clinical and experimental investigation. *J Craniofac Surg*. 2005 May;16(3):457-60.
- 9 Alves FC, Donato P, Sherry AD, Zahher A, Zhang S, Lubar AJ, Merrit ME, Lenkinsky RE, Frangioni JV, Neves M Prata MI, Santos AC, de Lima JJ, Geraldles CF. Silencing of phosphonate-gadolinium magnetic resonance imaging contrast by hydroxiapatite binding. *Invest Radiol*. 2003 Dec;38(12):750-60.
- 10 Tinsley D, Watson CJ, Russell JL. A comparison of hydroxiapatite coated implant retained fixed and removable mandibular prostheses over 4 to 6 years. *Clin Oral Implant Res* 2001 Apr; 12. (2): 159-166.
- 11 Ito K, Yamada Y, Ishigaki R, Nanba K, Nishida T, Sato S. Effects of guided bone regeneration with non-resorbable and bioabsorbable barrier membranes on osseointegration around hydroxiapatite-coated and uncoated threaded titanium dental implants placed into a surgically-created dehiscence type defect in rabbit tibia: a pilot study. *J. Oral Sci* 2001 Mar; 43 (1): 61-67.
- 12 Karabuda C, Ozdemir O, Tosun T, Anil A, Olgac V. Histological and clinical evaluation of 3 different grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases. *J Periodontol* 2001 Oct; 72 (10): 1436-1442.
- 13 Proussaefs P. Histologic evaluation of a threaded hydroxiapatite-coated root-form implant located at a dehisced maxillary site and retrieved from a human subject: a clinical report. *J Prosthet Dent* 2002 Feb; 87 (2): 140-144.
- 14 Hallman M, Hedin M, Sennerby L, Lundgren S. A prospective 1-year clinical and radiographic study of implants placed after maxillary sinus floor augmentation with bovine hydroxiapatite and autogenous bone. *J Oral Maxillofac Surg* 2002 Mar; 60 (3); 277-284.

15 Mangano C, Bartolucci EG, Mazzoco C. A new porous hydroxiapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Jan-Feb;18(1):23-30.

16 Rungcharassaeng K, Lozada JL , Kan JY, Kim JS, Campagni WV , Munoz CA. Peri-implant tissue response of immediately loaded, threaded, HA-coated implants: 1-year results. *J Prosthet Dent* 2002 Feb; 87 (2): 173-181.

17 LeGeros R.Z, Parsons J.R, Daculsi G., Walker M. Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramic: biodegradation-bioresorption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988; 523:268-271.

18 Jarcho J. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop.* 1981; 157: 259-278.

ANEXOS

Tabla 1

Hallazgos histopatológicos y toxicidad local del material de ensayo, en todos los períodos de implantación (12, 26, 52 y 104 semanas)

Material	APAFILL				
	0	0.5	1	2	3
Necrosis	X	-	-	-	-
Inflamación	X	-	-	-	-
Fibrosis	X	-	-	-	-
Toxicidad	X				

Tabla 2

Hallazgos histopatológicos del Control, por cada período de implantación

	Períodos			
	12semanas	26 semanas	52 semanas	104 semanas
Hallazgos				
Necrosis	0	0	0	0
Inflamación	0	0	0	0
Fibrosis	2	1	0,5	0
Toxicidad	0	0	0	0

LEYENDA:

El sistema de puntuación de 0 a 3 se basó en el número de elementos observados al microscopio con mayor aumento (470x), en un promedio de 5 campos examinados.

- Para la inflamación, la puntuación se basó en el número de células inflamatorias observadas por campo, como sigue:

0 - No se observan.

1.5 - de 1 a 5 células.

1 - de 6 a 15 células.

2 - de 16 a 25 células.

3 - de 26 o más células.

- Para la Necrosis y Fibrosis, la puntuación de 0 a 3 es:

0 - Ausente

0.5 - Mínimo (presente en menos de un cuarto del área implantada).

1 - Ligero (presente en un cuarto o más del área implantada sin llegar a dos).

2 - Moderado (presente en dos cuartos del área implantada).

3 - Intenso (presente en más de dos cuartos del área implantada).

- Para la Toxicidad local, se empleó el siguiente intervalo de puntuación:

0- No tóxico (Ausencia de elementos inflamatorios, de necrosis u otro tipo de alteración).

0.5 - Toxicidad Muy ligera (Escala 0.5 de la inflamación).

0 - Toxicidad Ligera (Escala 1 de la inflamación y hasta 1 de la fibrosis).

1 - Toxicidad Moderada (Escala 2 de la inflamación y hasta 2 de la fibrosis).

2- Toxicidad Intensa (Escala 3 de la inflamación y desde 0.5 hasta 3 de la necrosis).

Figuras

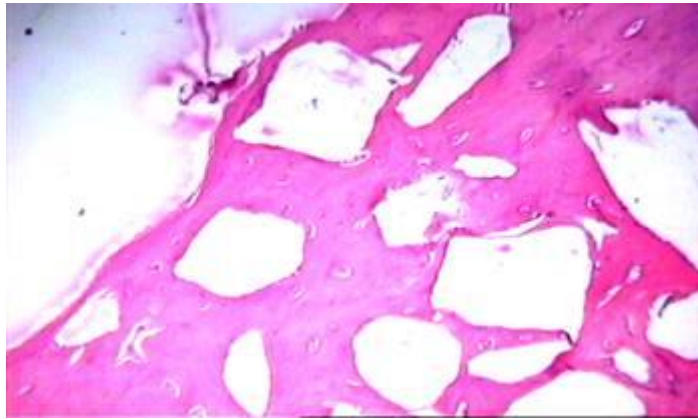


Fig. 1. Aspecto microscópico del hueso implantado con Apafill a los 2 años. X 100 H y E.

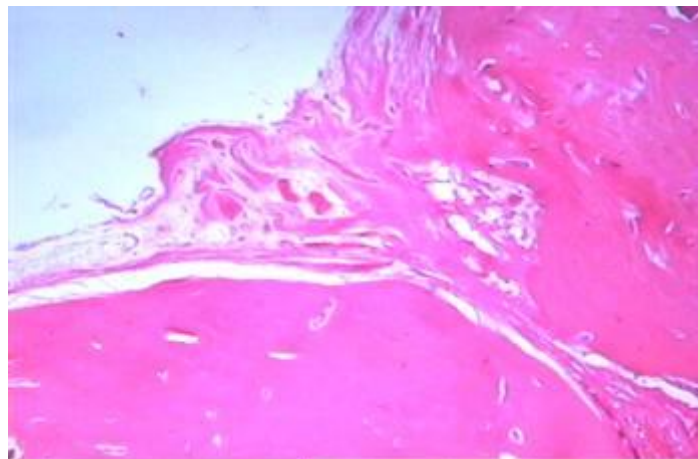


Fig. 2. Aspecto microscópico del hueso cubriendo la cavidad del control. Se observa persistencia de fibrosis a las 26 semanas. X 100 H y E.