

Biomecánica, 16 (1), 2008, pp. 13-20

Formulación de cementos bioactivos mediante la adición de sales de Hidroxiapatita-Estroncio

L. HERNÁNDEZ, M. GURRUCHAGA, I. GOÑI
POLYMAT. Dpto de Ciencia y Tecnología de Polímeros
Facultad de Química. UPV-EHU

Resumen

Se han formulado cementos óseos acrílicos inyectables para su uso en vertebroplastia (VP) y se les ha proporcionado bioactividad mediante la incorporación de sales de hidroxiapatita estroncio (HASr). El objetivo es combinar la fijación inmediata que proporciona el cemento acrílico, con la fijación a largo plazo que proporciona la HASr. Además, la presencia de Sr en la carga proporciona radiopacidad, con lo cual se evita la adición de agentes radiopacos adicionales. Así, se estudió el efecto de la incorporación de la HASr en las propiedades del cemento óseo. La adición se realizó en la fase sólida de 2 modos diferentes: en polvo, tal como se obtiene tras la síntesis y después de un sencillo tratamiento superficial con monómero. Los resultados muestran que el tratamiento mejora la mojabilidad de las partículas, lo que mejora la inyección de estos cementos y proporciona propiedades mecánicas superiores, sin perjudicar al contenido de monómero residual. La formulación de cemento idónea para VP sería la que contiene un 20% de HASr tratada, ya que presenta una inyectabilidad mejorada, elevada radiopacidad, la mayor bioactividad y además, la mejora de propiedades mecánicas es significativa.

Palabras clave: Cemento óseo acrílico, tratamiento superficial, bioactividad, inyectabilidad, propiedades mecánicas.

Abstract

Bioactive and injectable bone cements designed to perform vertebroplasty (VP) have been prepared by adding strontium hydroxyapatite (SrHA) to a formulation based on methylmethacrylate. Thus, the cement combines the immediate support given by the setting of the acrylic matrix, with the long term integration due to the incorporation of the SrHA, which elicits an osteogenic response and the subsequent osteointegration of the implant. Moreover, the presence of Strontium makes this filler highly radiopaque, which avoids the undesirable and extended practice of the addition of more radiopaque substances by the surgeon. For that purpose, the effect of the addition of SrHA particles, incorporated 'as synthesised' and after a surface treatment with the monomer, was studied on various properties of the cement. Results showed that the surface treatment improved the wettability of the SrHA particles, and, as a consequence, the mixing, the injectabilities and the mechanical properties, without increasing the residual monomer content. The best formulation to perform VP is 20%-treated SrHA containing formulation, which shows enhanced injectability and mechanical properties compared with control formulations, along with high radiopacity and the higher bioactivity.

Keywords: Acrylic bone cement, bioactivity, surface treatment, injectability, mechanical properties.

Correspondencia:
POLYMAT. Dpto. Ciencia y Tecnología de Polímeros.
Facultad de Química. UPV-EHU.
Apdo. 1072, 20080 San Sebastián.
popgoeci@sc.ehu.es

Introducción

La vertebroplastia percutánea (VP) es una técnica de cirugía mínimamente invasiva que consiste en la inyección bajo guía fluoroscópica de un cemento acrílico en una vértebra lesionada con el objetivo de reforzar el hueso y aliviar el dolor. Las formulaciones de cementos óseos utilizados para llevar a cabo la VP son sistemas de dos fases basados en polimetacrilato de metilo (PMMA), similares a los utilizados en prótesis de cadera. Sin embargo, este material presenta una gran desventaja: su baja adhesión a las superficies óseas (no son bioactivos), ya que no poseen la capacidad de integrarse o enlazarse químicamente con el hueso huésped. Esto es debido a que el PMMA es un material inerte, desde el punto de vista de la adhesión al hueso, y se enlaza al mismo mediante la fijación física producida por la interdigitación de la masa fluida de cemento en las irregularidades de la cavidad ósea. Proporciona así un buen refuerzo mecánico pero con las limitaciones asociadas al envejecimiento y desgaste del material.

Puesto que el hueso es un composite de colágeno y apatita, parece muy razonable formular un composite de una carga bioactiva con una matriz de tipo polimérico a la hora de sustituir tejidos óseos, que combine de este modo las ventajas de ambos componentes, es decir, la fijación inmediata del cemento óseo acrílico con la fijación a largo plazo que proporcionaría la carga bioactiva. De hecho, debido a su larga historia y a su éxito clínico, el PMMA ha sido uno de los materiales más utilizados a la hora de elaborar nuevos cementos bioactivos [1]. En la bibliografía se pueden encontrar cementos acrílicos basados en PMMA cargados con HA[2], biovidrios[3], nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂)[4], acetato cálcico[5,6]...

En este trabajo, se seleccionó como carga bioactiva una sal de hidroxiapatita- estroncio (HASr). Esta elección se debe, por un lado, a que la hidroxiapatita (HA, Ca₄H(PO₄)₃) es una de las cerámicas preferidas a la hora de formular cementos bioactivos por su similitud al componente mineral del hueso [7], lo que le proporciona una gran afinidad química y biológica con el tejido óseo que da como resultado una gran biocompatibilidad. Además, el estroncio (Sr) se ha incorporado frecuentemente en la formulación de biomateriales, bien en la formulación de cementos de fosfato de calcio [8,9], o bien como HASr en cementos acrílicos basados en composites de bis-GMA (bisfenol- A glicidilmetacrilato), dando como

resultado cementos de excelente biocompatibilidad y capacidad de osteointegración [10,11].

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo será formular un cemento bioactivo mediante la incorporación de HASr a una formulación basada en PMMA, que ha sido diseñada para que posea una fluidez adecuada para llevar a cabo la VP. La presencia de un elemento de elevado número atómico como el Sr en la carga bioactiva, proporcionará la visibilidad necesaria durante la inyección, sin la necesidad de incorporar agentes radiopacos adicionales. Además, se realizará un tratamiento superficial del polvo de HASr y se estudiará el efecto del mismo y de otras variables como el contenido de carga en las propiedades del cemento óseo.

Materiales y Métodos

Síntesis de la carga bioactiva y caracterización

La reacción se llevó a cabo según el método descrito por Li y colaboradores [10]. Para ello, se prepararon dos disoluciones: la primera, una disolución de 0,5 moles de Ca(OH)₂ (Riedel-de-Haën) y 0,1 moles de Sr(OH)₂ (Riedel-de-Haën) en 150 ml de agua destilada, y la segunda, a partir de 0,2 moles de P₂O₅ (Scharlau) y 0,2 moles de NaHCO₃ (Scharlau) en 100 ml de agua destilada.

A un reactor de un litro que contenía la disolución de hidróxidos se le añadió la segunda, gota a gota, bajo agitación mecánica. A continuación, se ajustó el pH a 9,5 con una disolución de HCl, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente. Después de tres días, se neutralizó hasta pH 7,4 con HCl diluido y se filtró el sólido de reacción con papel de filtro doble. El polvo se secó en la mufla a 500°C durante 24 h. La HASr obtenida es una solución sólida de calcio y estroncio que podríamos expresar como: Ca_{10-x}Sr_x(PO₄)₆(OH)₂.

Con el fin de mejorar la compatibilidad de las partículas de HASr con la matriz polimérica, se realizó un sencillo tratamiento superficial con el monómero, que a juzgar por los datos aparecidos en la bibliografía daba buenos resultados [12]. Así, el polvo de HASr (20g), tras ser secado a 120°C durante 24 h, se añadió a 100 ml de MMA, y se aplicaron ultrasonidos durante 3 h. Tras esto, la mezcla fue centrifugada a 3.000 r.p.m. a temperatura ambiente para eliminar el MMA no adsorbido por decantación. Finalmente, el polvo de HASr tratado se secó a 60°C durante 24 horas. Tras el tratamiento, el contenido de MMA en la

HASr tratada, calculado mediante métodos termogravimétricos, era de 0,36% en peso.

Preparación de los cementos

Se prepararon cementos con 10 y 20% de HASr (tratada y sin tratar) en la fase sólida. A pesar de que una mayor cantidad de carga es favorable desde el punto de vista de la bioactividad y la radiopacidad, la incorporación de mayores cantidades de HASr causaba problemas de mezclado y perjudicaba a las propiedades mecánicas. Las formulaciones utilizadas como referencia fueron una formulación radiolúcida y otra con un 10% de BaSO₄.

La preparación de los cementos se llevó a cabo de acuerdo a la norma ISO 5833/1992(E) y se prepararon en todos los casos con una relación polvo/líquido igual a 2. Los cementos contenían un 1,25% en peso de peróxido de benzoilo (BPO, Merck) en la fase sólida mezclado en las perlas de PMMA. Los ingredientes de la fase líquida eran metacrilato de metilo (MMA, Merck) y un 1% en volumen de N,N-dimetil-p-toluidina (DMT, Merck). En cuanto a las perlas de PMMA utilizadas en la fase sólida, se utilizó una mezcla de perlas de PMMA Colacryl® DP300 (Lucite Polymers) con Plexigum® (Rohm & Haas), en proporción 80/20 (en peso), dado que en un estudio previo se demostró que proporcionaban la fluidez necesaria para llevar a cabo la VP [13]

Técnicas experimentales

Se estudiaron las **cinéticas de fraguado** según la norma ISO 5833:1992 (E). Las determinaciones del **contenido de monómero residual** se realizaron por medio de resonancia magnética nuclear de protón (RMN) utilizando muestras de cemento recolectadas tras una hora de reacción a 37°C. Los espectros de resonancia fueron registrados utilizando cloroformo deuterado como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna en un espectrofotómetro FT-NMR Bruker de 300 MHz. El estudio de **bioactividad** se realizó inyectando el cemento óseo directamente en solución de Kokubo o SBF, que se prepara con el fin de tener una concentración de iones prácticamente igual a la del plasma sanguíneo humano [14]. Tras un mes de inmersión a 37°C, las muestras se extrajeron del medio y se aclararon con agua desionizada. Una vez seco el cemento, se observó su superficie mediante SEM y se comparó con la superficie del cemento curado al aire. Para determinar la composición de las

partículas que se observaron, se realizaron los espectros FTIR del polvo obtenido al raspar con una cuchilla la superficie del cemento. Para realizar los ensayos de **inyectabilidad**, se prepararon unos 4 gramos de cemento y se cargaron en una jeringa de 2 ml que se acopló a una aguja de biopsia de 8 gauge de diámetro y 15 cm de longitud y se inyectó el cemento en un recipiente. La inyectabilidad se define como el porcentaje en peso del cemento inyectado en el recipiente, con respecto a la masa de cemento cargado en la jeringa. Además, se realizaron ensayos adicionales para conocer el intervalo de tiempo en el que los cementos mantienen la fluidez suficiente como para ser inyectados. Se realizaron **ensayos de compresión** según la norma 5833:1992(E) con probetas en seco y almacenadas en SBF a 37°C durante un mes. Por último, para determinar la **visibilidad** de los cementos a los **rayos X**, se elaboraron probetas rectangulares (1x10x25 mm) de todas las formulaciones y se realizó una fluoroscopia en unas condiciones de 25 KV de potencia y 4 mAS.

Análisis de los resultados

El valor medio y la desviación estándar de los diferentes parámetros estudiados en los ensayos realizados fueron calculados mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) de una variable y comparaciones múltiples mediante el test de Fischer PLSD. Esta técnica valora si las diferencias observadas entre los diferentes cementos ensayados son significativas. El intervalo de confianza utilizado fue de un 95%.

Resultados y Discusión

Las cinéticas de fraguado de los cementos estudiados se muestran en la Figura 1. Como se puede ver, la adición de HASr en cualquiera de sus formas no afecta significativamente a la temperatura máxima con respecto a las formulaciones de referencia. En cuanto a los tiempos de fraguado, las formulaciones con 10% de HASr no presentan diferencias significativas con respecto a la formulación comercial. En cambio, se observó un aumento significativo de este parámetro con respecto al cemento de referencia en las formulaciones con un 20% de carga. Este aumento es debido al mayor porcentaje de carga bioactiva que dificulta el mezclado de las dos fases y retrasa la polimerización. El tratamiento superficial, al mejorar la compatibilidad de la carga con el medio orgánico, mejora las características

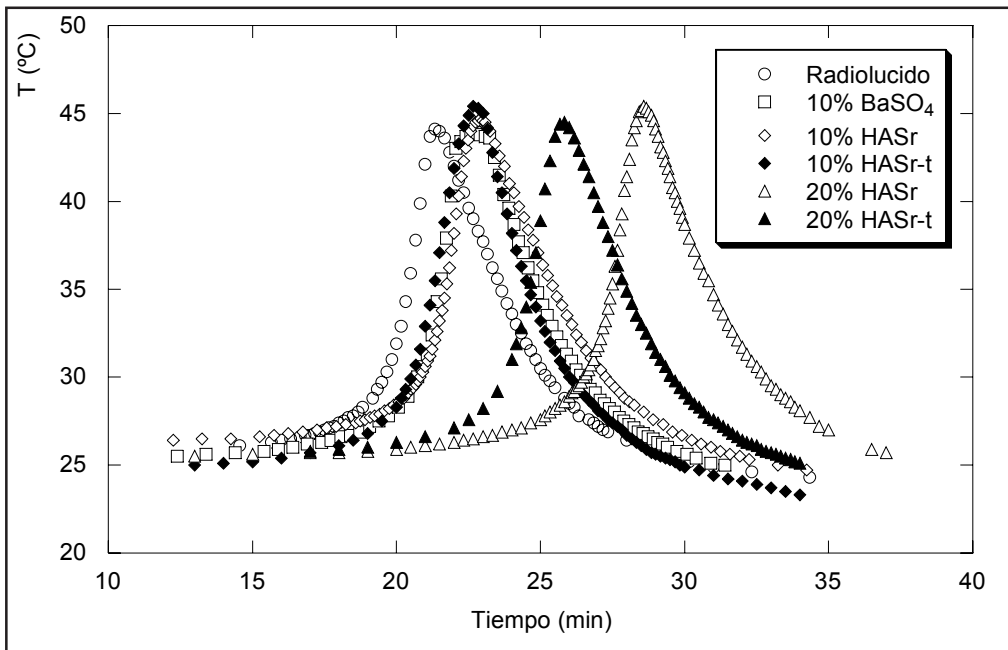


Figura 1. Cinéticas de fraguado de los cementos con HASr y las formulaciones de control

COMPOSICIÓN	M_r (%mol) (D.S.)
Radiolúcido	2,25 (0,24)
10% BaSO ₄	2,38 (0,24)
10% HASr	2,22 (0,29)
10% HASr-t	2,56 (0,25)
20% HASr	2,42 (0,13)
20% HASr-t	2,34 (0,16)

Tabla 1. Contenido de monómero residual expresado como porcentaje en moles

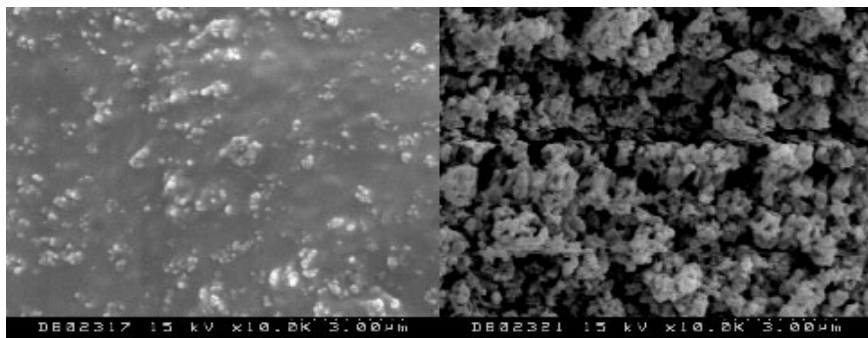


Figura 2. Micrografías de SEM de la superficie del cemento con 20% de HASr tratada antes de sumergir en SBF (izquierda) y tras 28 días de inmersión en SBF a 37°C (derecha)

de mezclado del cemento y, como consecuencia, no aumenta tanto el tiempo de fraguado. En efecto, la formulación 20% HASr-t presenta un descenso significativo del tiempo de fraguado con respecto a la formulación con 20% de HASr sin tratar.

Las determinaciones de monómero residual (Tabla 1) muestran que la adición de HASr no afecta significativamente a este parámetro si lo comparamos con las formulaciones de control. Además, como era de esperar, debido al bajo porcentaje de monómero que contiene la carga tratada, que además, probablemente haya polimerizado, no se ha observado un aumento estadísticamente significativo en el contenido de monómero residual entre las formulaciones con partículas tratadas con MMA o sin tratar.

La bioactividad de un material *in vivo* se manifiesta en una primera fase por la deposición

de apatita natural en la superficie del mismo que a largo plazo podría producir su osteointegración. Este fenómeno se puede reproducir *in vitro* sumergiendo el material en un medio fisiológico simulado libre de proteínas y células (SBF o solución de Kokubo). De este modo, es posible evaluar la bioactividad del cualquier material examinando los cambios estructurales que experimenta su superficie al ser sumergido en SBF. En la Figura 2 se muestran las micrografías de las superficies de la formulación con 20% de HASr tratada a 10.000 aumentos, donde se ha observado la mayor deposición, ya que la superficie aparece completamente cubierta de apatita tras 28 días de tratamiento. En la Figura 3 se pueden ver los espectros obtenidos de la superficie de todos los cementos, antes y después de la inmersión en SBF. Para los cementos sin tratar, la banda del PMMA (señalada con un asterisco)

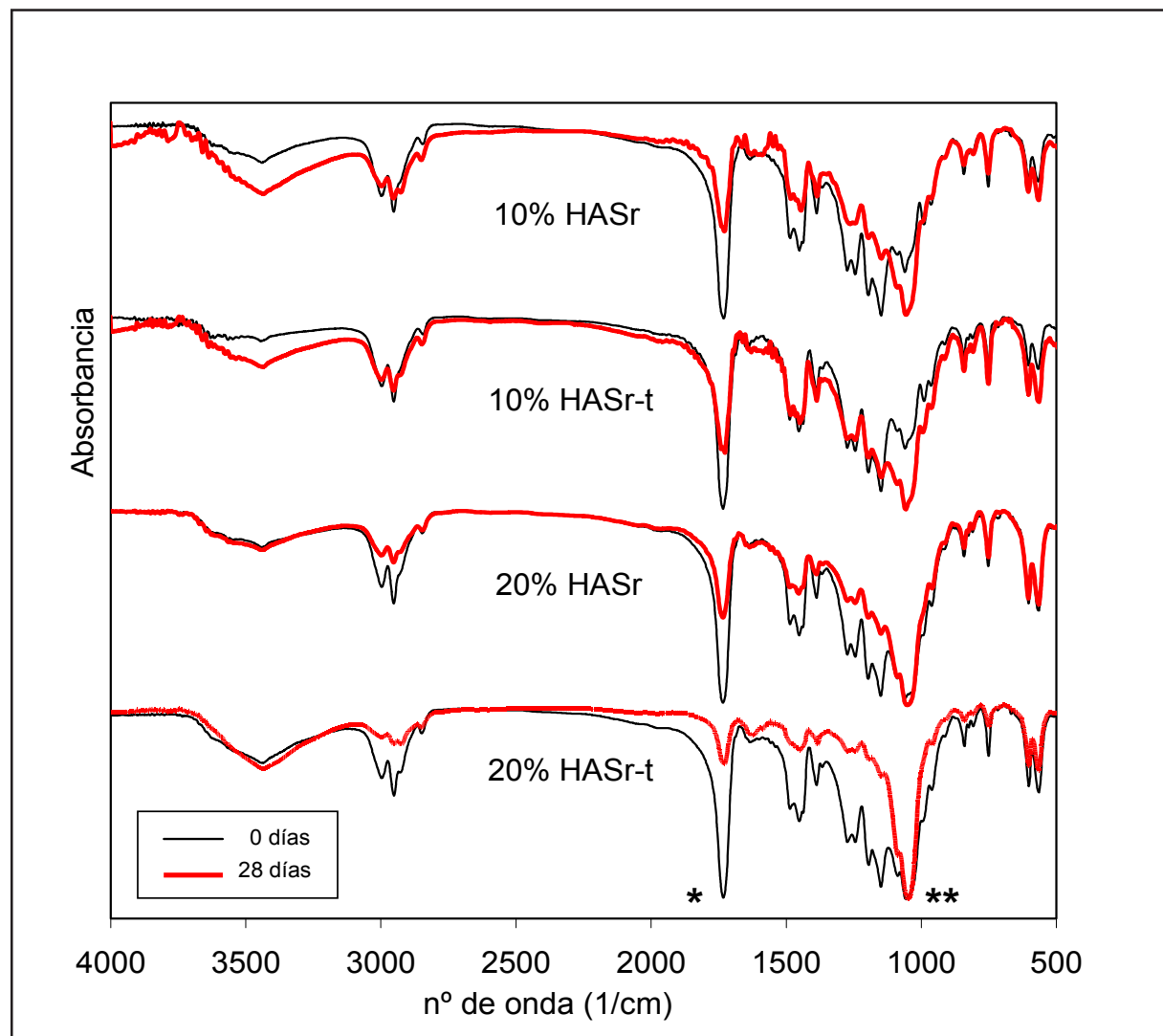


Figura 3. Espectros FTIR obtenidos de una muestra de la superficie de los cementos curados en aire (0 días) o curados en SBF y tratados durante 28 días

es notablemente más intensa que la de la hidroxiapatita (**). En cambio, tras 28 días de inmersión en SBF, la intensidad relativa de las bandas se invierte, es decir, que la banda de la hidroxiapatita es mucho más intensa que la banda correspondiente al polímero. Esto nos hace suponer que, efectivamente, en condiciones fisiológicas, se produce la deposición de partículas de apatita. Una estimación del cambio producido en la composición de la superficie de los cementos con el tratamiento en SBF, mostró que el aumento en la relación de intensidades es de aproximadamente el doble en todos los cementos, exceptuando al cemento 20% HASr-t, en el que el aumento de la intensidad de la banda correspondiente a la hidroxiapatita es mucho

mayor, lo que concuerda con lo observado en las micrografías de SEM.

Los resultados de inyectabilidad se muestran en la Tabla 2. El tiempo de mezclado fue el mismo para todas las formulaciones (3 minutos). Los porcentajes de inyectabilidad son elevados y similares para todas las formulaciones, debido a las perlas de PMMA empleadas en la fase sólida. Además, se observa un ligero aumento de inyectabilidad con el tratamiento de MMA. A pesar de que no se observan grandes diferencias en los tiempos de inyección ni en los porcentajes de inyectabilidad, el tratamiento mejora mucho la manejabilidad de los cementos, ya que parece que ejerce un efecto lubricante. En el caso de los

Composición	t _{inyección} (min)	I (%)
Radiolúcido	5,43 (0,28)	83,17 (1,11)
10% BaSO ₄	5,91 (0,31)	78,20 (1,42)
10% HASr	6,07 (1,80)	79,70 (1,70)
10% HASr-t	6,89* (0,44)	83,20*·' (1,44)
20% HASr	6,90* (0,42)	78,22 (2,39)
20% HASr-t	7,50* (1,44)	83,12*·' (0,36)

Tabla 2. Resultados de los ensayos de inyectabilidad. Se indican los valores con diferencias estadísticamente significativas respecto al cemento con 10% de BaSO₄ (*) y a la formulación con la misma cantidad de HASr sin tratar (')

Composición	Ensayos en seco		Ensayos en mojado	
	σ _c (MPa)	E _c (MPa)	σ _c (MPa)	E _c (MPa)
Radiolúcido	112 (4)	1800 (100)	103 (4)	1620 (60)
10% BaSO ₄	107 (5)	1700 (40)	93 (5)	1520 (50)
10% HASr	104 (4)	1900* (70)	94 (2)	1690* (60)
10% HASr-t	109' (1)	1920* (30)	96 (2)	1720* (50)
20% HASr	106 (4)	1980* (80)	90 (6)	1720* (90)
20% HASr-t	111' (2)	2070*·' (40)	98*·' (1)	1780* (50)

Tabla 3. Resultados de compresión de los cementos ensayados en seco y tras un mes de inmersión en SBF a 37°C. Se indican los valores con diferencias estadísticamente significativas respecto al cemento con 10% de BaSO₄ (*) y a la formulación con la misma cantidad de HASr sin tratar (')

cementos sin tratar, aunque a tiempos altos son fluidos, no atraviesan bien la jeringa y tienden a comprimirse sin salir de la misma, lo que hace necesaria una gran fuerza para llevar a cabo la inyección. En cambio, la fuerza necesaria para inyectar los cementos con partículas tratadas es mucho menor, extruyéndose la totalidad del cemento sin problemas.

Los resultados obtenidos en el ensayo de compresión se muestran en la Tabla 3. Tanto los cementos ensayados en seco como en mojado superan ampliamente la σ_c mínima establecida por la Norma (70 MPa). Si nos fijamos en la resistencia en compresión en seco, los cementos con HASr no presentan diferencias significativas con respecto al cemento con $BaSO_4$. Asimismo, se puede observar que el tratamiento de las partículas de HASr mejora la resistencia a compresión de manera significativa. Al igual que se ha comentado al analizar otros parámetros, esta mejora se atribuye a una mayor integración de la carga con la matriz. En cuanto al módulo, las probetas con HASr presentan valores significativamente superiores a las formulaciones de referencia. El módulo aumenta con el porcentaje de carga (de manera significativa sólo en los cementos tratados) debido a la rigidez de la misma. Además, en el caso de las probetas con 20% de carga bioactiva, el tratamiento produce un aumento significativo en el módulo, debido nuevamente a la mayor compatibilidad de la carga

con la matriz polimérica, que produce una transmisión más eficiente de esfuerzos entre la carga y la matriz.

En los ensayos realizados con probetas tras un mes de inmersión en SBF a $37^\circ C$, el efecto plastificante del agua absorbida nuevamente provoca un descenso significativo de la resistencia y del módulo en compresión con respecto a las probetas ensayadas en seco. Las formulaciones experimentales y con 10% de $BaSO_4$ presentan resistencias similares, excepto en el caso del cemento con 20% de HASr tratada, que presenta una resistencia significativamente superior. Esta mejora se debe al tratamiento de las partículas y al mayor porcentaje de carga, que en este caso actúa como refuerzo. Si nos fijamos en el módulo, de nuevo todos los cementos experimentales presentan un aumento significativo del módulo con respecto a los cementos de referencia.

La imagen fluoroscópica (Figura 4), muestra que la radiopacidad de los cementos con un 10% de HASr es similar a la del cemento estándar. Además esta técnica nos permite comprobar visualmente la mayor homogeneidad de los cementos obtenidos con la carga tratada con monómero. Si nos fijamos en las formulaciones con 20% de carga, podemos comprobar que la radiopacidad es muy superior a la de la formulación comercial con 10% de $BaSO_4$, y sólo ligeramente inferior a la que contiene un 30% del agente radiopaco tradicional.

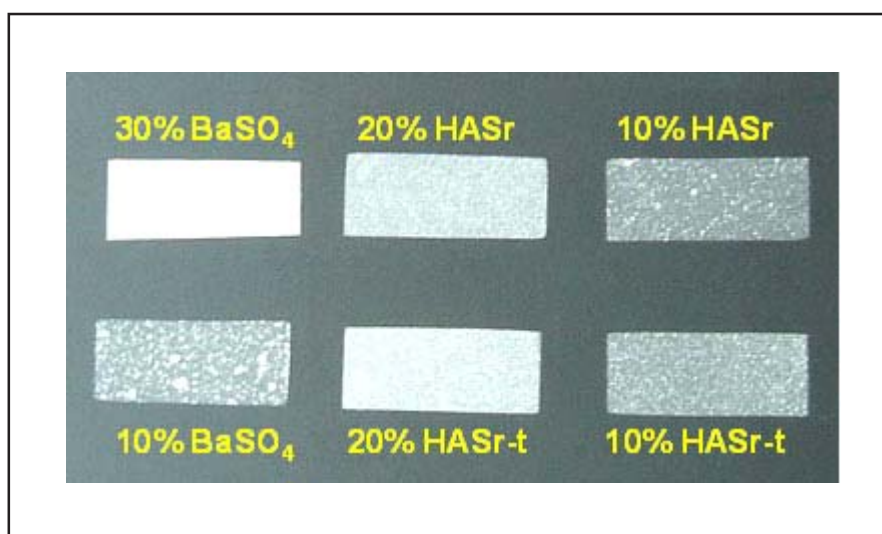


Figura 4. Imagen fluoroscópica de las probetas

Conclusiones

Se han formulado cementos inyectables bioactivos mediante la incorporación de HASr, cuyo tratamiento superficial con MMA proporciona un comportamiento reológico mejorado y mejores propiedades mecánicas, sin perjudicar al contenido de monómero residual. La formulación de cemento idónea para VP sería la que contiene un 20% de HASr tratada, ya que presenta una elevada radiopacidad, la mayor bioactividad y además, la mejora de propiedades mecánicas es significativa.

Agradecimientos

Las autoras agradecen la financiación recibida a través del proyecto MCYT-MAT 2002-04147-CO2-01 y la beca de formación de personal investigador de los grupos consolidados (código 9/UPV 00203.215-13540/2001), que han hecho posible la realización de este trabajo.

Bibliografía

1. **Kenny SM, Buggy M.** Bone cements and fillers: A review. *J Mat Sci: Mat Med* 2003; 14: 923-938.
2. **Vallo CI, Montemartini PE, Fanovich MA, Porto López JM, Cuadrado TR.** Polymethylmethacrylate-based bone cement modified with hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 1999; 48: 150-158.
3. **Méndez JA, Fernández M, González-Corchón A, Salvado M, Collía F, de Pedro JA, Levenfeld BL, López-Bravo A, Vázquez B, San Román J.** Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials* 2004; 25: 2381-2392.
4. **Goto K, Tamura J, Shinzato S, Fujibayashi S, Hashimoto M, Kawashita M, Kokubo T, Nakamura T.** Bioactive bone cements containing nano-sized titania particles for use as bone substitutes. *Biomaterials* 2005; 26: 6496-6505.
5. **Mori A, Ohtsuki C, Miyazaki T, Sugino A, Tanihara M, Kuramoto K, Osaka A.** Synthesis of bioactive PMMA bone cement via modification with methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium acetate. *J Mat Sci: Mat Med* 2005; 16: 713-718.
6. **Tsukeoka T, Suzuki M, Ohtsuki C, Sugino A, Tsuneizumi Y, Miyagi J, Kuramoto K, Moriya H.** Mechanical and histological evaluation of a PMMA-based bone cement modified with α -methacryloxypropyltrimethoxysilane and calcium acetate. *Biomaterials* 2006; 27: 3897-3903.
7. **Zaffe D.** Some considerations on biomaterials and bone. *Micron* 2005; 36: 583-592.
8. **Saint-Jean SJ, Camiré CL, Nevsten P, Hansen S, Ginebra MP.** Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted α -TCP cements. *J Mat Sci: Mat Med* 2005; 16: 993-1001.
9. **Kim HW, Koh YH, Kong YM, Kang JG, Kim HE.** Strontium substituted calcium phosphate biphasic ceramics obtained by a powder precipitation method. *J Mat Sci: Mat Med* 2004; 15: 1129-1134.
10. **Li YW, Leong JCY, Lu WW, Luk KDK, Cheung KMC, Chiu PKY, Chow SP.** A novel injectable bioactive bone cement for spinal surgery: a development and preclinical study. *J Biomed Mater Res* 2000; 52: 164-170.
11. **Wong CT, Chen QZ, Lu WW, Leong JCY, Chan WK, Cheung KMC, Luk KDK.** Ultrastructural study of mineralization of a strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) cement in vivo. *J Biomed Mater Res* 2004; 70A: 428-435.
12. **Zhao F, Lu WW, Luk KDK, Cheung KMC, Wong CT, Leong JCY, Yao KD.** Surface treatment of injectable strontium-containing bioactive bone cement for vertebroplasty. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2004; 69B: 79-86.
13. **Hernández L, Gurruchaga M, Gonbi I.** Influence of powder particle size distribution on complex viscosity and other properties of acrylic bone cement for vertebroplasty and kyphoplasty. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2006; 77: 98-103.
14. **Kokubo T, Kim HM, Kawashita M.** Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003; 24: 2161-2175.