

Respuesta ósea al implante del compuesto beta-fosfato tricálcico-colágeno (β -FTC-C).

Estudio «in vivo» en conejos

L. R. MESEGUER OLMO, M. ALCARAZ BAÑOS, V. VICENTE ORTEGA, M. CLAVEL-SAINZ NOLLA
y A. GALIAN CÁNOVAS

Laboratorio de. Cirugía Ortopédica Experimental. Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.

Resumen.—Se ha estudiado la correlación entre los hallazgos histológicos y las imágenes radiológicas de un compuesto de beta-fosfato tricálcico y colágeno (β -FTC-C) después de su implantación en defectos óseos creados experimentalmente en 21 conejos de 4 Kg de peso medio. Bajo anestesia general los defectos óseos creados en ambos fémures se rellenaron con un cilindro de 4,5 x 6 mm del compuesto. Los animales fueron sacrificados a la semana y 1, 2, 4 y 12 meses del postoperatorio. Las muestras obtenidas fueron sometidas a estudio radiográfico e histológico. Microscópicamente se comprobó que el compuesto a lo largo del período de implantación sufrió un proceso de reabsorción progresiva mediado por células de estirpe macrófaga y que se correspondió con una disminución de la densidad radiológica y cambios en su morfología. A los doce meses del postoperatorio se observaron escasos restos del material, hecho que se corresponde con la desaparición del implante en la placa radiográfica.

BONE RESPONSE TO P-TRICALCIUM PHOSPHATE-COLLAGEN COMPOSITE. AN IN VIVO STUDY IN RABBITS

Summary.—The correlation between histologic and radiological findings was studied after implantation of a composite (β -FTC-C) into osseous defects which were experimentally induced in 21 rabbits. Under general anaesthetic osseous defects were made in both femurs and filled in with a 4,5 x 6 mm composite cylinder. The animals were killed at the first week and, one, two, four and twelve months after surgery. X-ray study and microscopic examination were made in all the specimens. Throughout the implantation period, it was microscopically proven that the composite showed a progressive reabsorption process, mediated by cells of macrophagus lineage. A decrease in radiologic density and changes in its morphology were also observed. At the end of the study (twelve months), limited traces of the material could be seen, in correlation with the images of the X-ray films which revealed the total absence of the composite implant.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se han utilizado diferentes materiales con la intención de reparar o reemplazar segmentos óseos dañados (1-3). Entre éstos, por supuesto, se incluye el propio hueso en sus diferentes formas, colágeno, aleaciones de me-

tales, biovidrios, polímeros, cerámicas y «composites» o compuestos. Así, desde que se describió que el fosfato cálcico (FC) jugaba un papel predominante como integrante de la fracción inorgánica de todos los tejidos duros del organismo humano como hueso y dientes, se ha considerado a estas sales como un producto de influencia potencial sobre el proceso de reparación de los defectos óseos.

A principios del siglo actual, se empezaron a estudiar una serie de materiales que podían ser utilizados como sustitutos óseos temporales que permitían estimular o al menos facilitaban el crecimiento del

Correspondencia:

Dr. L. R. MESEGUER OLMO
Ronda de Levante, 2-1.º Izq.
30008 Murcia

hueso adyacente, mientras que dicho material era gradualmente reabsorbido. Así, Albee y Morrison (4) en 1920, fueron quienes encontraron el fosfato tricálcico (FTC), componente de la fracción inorgánica del hueso, cuando investigaban un inductor de la regeneración ósea para la curación de las fracturas.

Al mismo tiempo se comenzó a emplear el sulfato cálcico, yeso de París, para el relleno de defectos óseos (5-7), obteniéndose algunos éxitos, aunque desafortunadamente debido a la gran área de superficie de estos cristales, el yeso se reabsorbía rápidamente y se daban fracasos frecuentes. A pesar de ello, este material puede ser considerado como el precursor histórico de las nuevas cerámicas.

Fue a partir de los años 1970, cuando comenzó a despertar interés en algunos investigadores las cerámicas «biodegradables o bioreabsorbibles» de beta-fosfato tricálcico (β -FTC), (8-13).

Los avances continuos en este campo, han originado resultados impresionantes en cuanto a la biocompatibilidad y capacidad para estimular la formación de tejido óseo. Sin embargo, la naturaleza y el grado de respuesta del tejido dependen de las características del material, tales como, su composición química (14-17), textura de la superficie (18-20), porosidad, densidad, forma y tamaño (21-24).

MATERIAL Y MÉTODO

Para este estudio se han utilizado un total de 21 conejos de Nueva Zelanda, de 3900-4500g de peso y de 35-40 semanas de edad. El material empleado (β -FTC-C) corresponde a un compuesto resultante de la combinación de una biocerámica macro-microporosa reabsorbible, be-

ta-fosfato tricálcico (β -FTC), y colágeno (C). De las características del implante destacamos (Fig. 1 a y b): 1) Porosidad 40%, 2) Macroporosidad 250-400 micrones, 3) Microporosidad 10 micrones, 4) Tamaño de los gránulos 0,5 mm, 5) colágeno dérmico bovino liofilizado (4% del peso total).

Dos o tres semanas antes de la intervención, los animales fueron depositados de forma individual en sus respectivas jaulas con el fin de permitirles su adaptación. Se mantuvieron en una sala con una temperatura de 22 °C y con una humedad relativa de aire entre el 40-70% y una iluminación con fotoperíodo de 12h/12h luz-oscuridad y bebieron y comieron «*ad libitum*».

Hemos utilizado para realizar la cirugía de implante y para cada período de estudio un total de 3 animales, dos de ellos constituyeron el grupo válido para el estudio propiamente dicho, y el otro se mantuvo de reserva en previsión de posibles complicaciones que pudieran surgir en alguna de las fases del trabajo.

Bajo anestesia general con Atropina, Ketamina, Clorpromacina, en las dosis habituales se procedió a realizar con broca de 4,5 mm un defecto óseo metafisario distal en cara externa de ambos fémures, rellenándolos con bloque cilíndrico del compuesto de 6 mm de longitud por 4,5 mm de diámetro (Fig. 2). Los animales fueron sacrificados según calendario preestablecido, con una sobredosis de Thiopental por vía intravenosa, a la 1.^a semana, 1 mes, 2 meses, 4 meses y 12 meses después de la implantación.

Las muestras extraídas fueron sometidas a estudio radiográfico con proyecciones antero-posterior (AP) y lateral (L) utilizando un aparato Mamodiagnost UC y cassette-película Kodak Min-R. Posteriormente, hueso y ganglios linfáticos ilíacos, se fijaron en formol tamponado al 10%, obteniéndose secciones de 5 micras que fueron teñidas con Hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, y con la técnica de Gordon-Sweet, para su observación con un microscopio Leitz Orthoplan FSA.

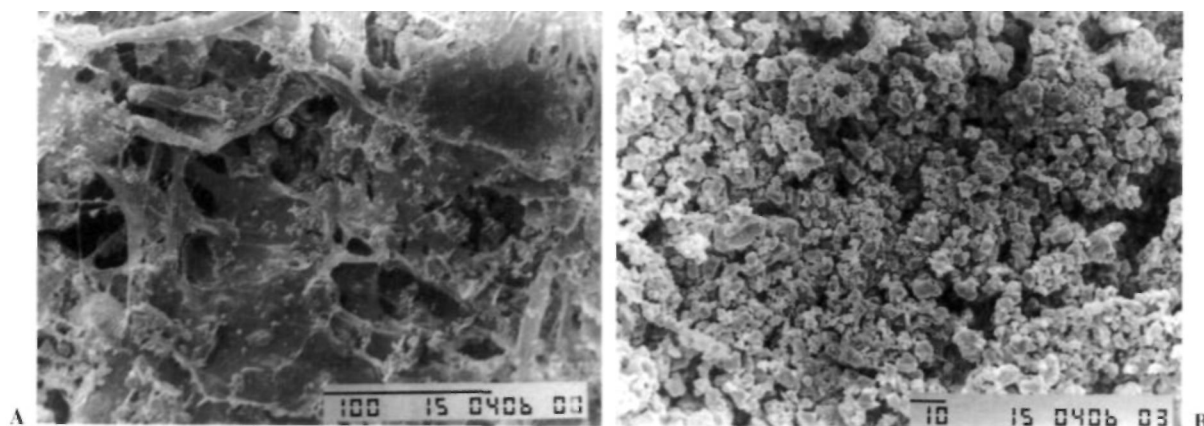


Figura 1. A) Visión con microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie de la muestra del composite macro-microporoso. (700 X). B) Detalle con M.E.B. de los microporos (700 X).

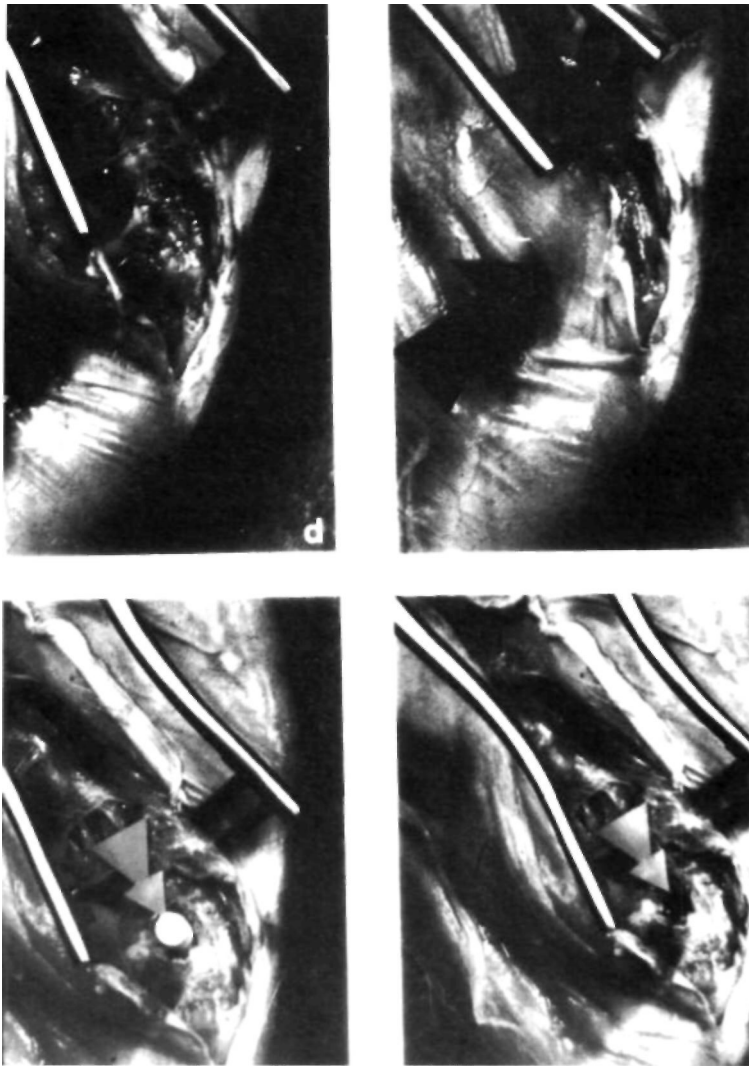


Figura 2. Área seleccionada para la creación del defecto óseo y su relleno con el implante (β -FTC-C).

RESULTADOS

I. Grupo de animales con implante de una semana de evolución

A) *Estadio radiológico* (Fig. 3)

El depósito de compuesto (β -FTC-C) se observa como una estructura rectangular y con una densidad radiológica heterogénea que es mayor a la densidad del hueso en el que se encuentra implantado. En el implante se observan dos tipos de estructuras: unas redondeadas, pequeñas (1 mm de diámetro), numerosas, de tamaño uniforme y de mayor densidad que el hueso, que corresponde al componente de β -FTC; otra, la de una sustancia homogénea de ligera menor densidad radiológica que la anterior y que constituye el material en el que se encuentran incluidas las anteriores, colágeno (C).

B) *Estadio microscópico óptico* (Fig. 4)

Las secciones histológicas realizadas de forma seriada muestran toda la superficie de sección del hueso tratado, incluyendo el área de implante del composite, el cual adopta una configuración cuadrangular, contactando los extremos con hueso trabecular normal. El material se dispone en cúmulos nodulares ligeramente eosinófilos íntimamente adosados en el seno de una red fibrilar delgada, más evidente con la técnica de tricrómico de Masson. Pueden observarse escasas trabéculas neoformadas en la periferia, siendo excepcionales en el interior del implante. En el seno del material implantado suelen observarse pequeños islotes de médula ósea hematopoyética en continuidad con la de la periferia.

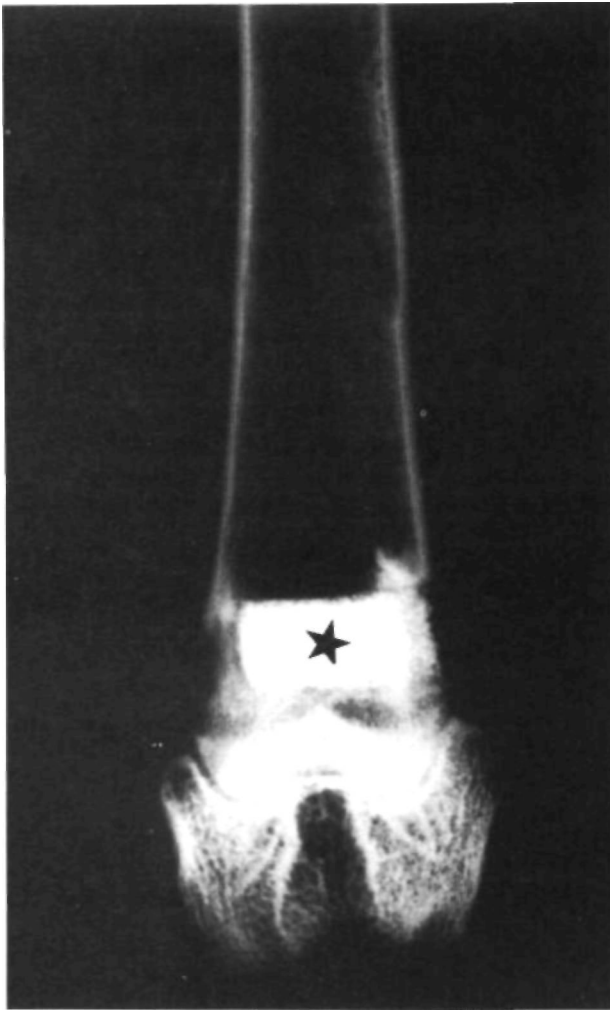


Figura 3. Proyección anteroposterior (AP) del extremo distal del fémur, donde se observa el cilindro del compuesto incluido en la metafisis, a la semana de su implantación (estrella).

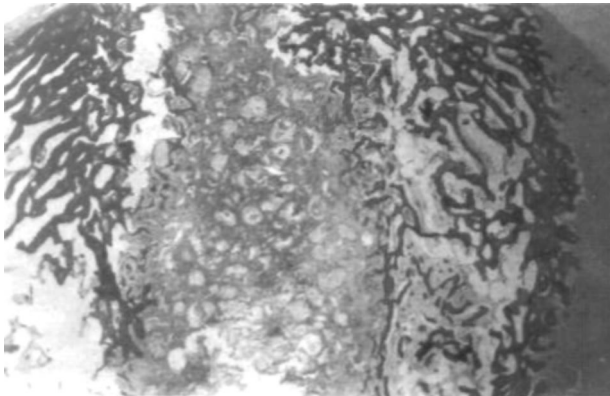


Figura 4. Imagen panorámica de sección ósea que incluye la zona implantada: Hueso trabecular de características normales en la periferia e implante de Beta-FTC-C en la porción central. (H.E. 125 X).

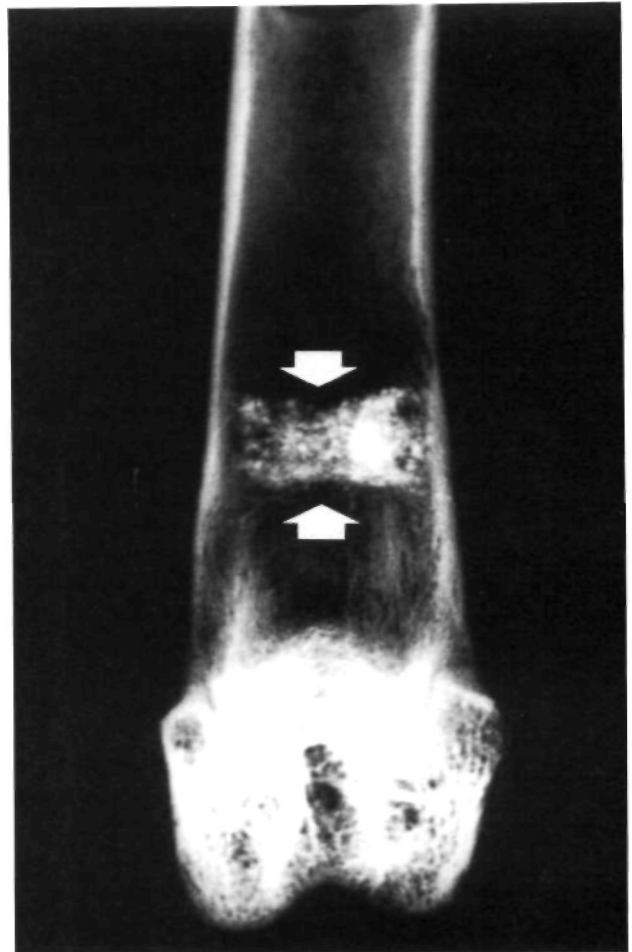


Figura 5. Proyección AP del extremo distal del fémur. Se observa una disminución generalizada de la densidad radiológica y un contorno irregular del implante (flecha).

II. Grupo de animales con implante de un mes de evolución

A) Estudio radiológico (Fig. 5)

En esta fase, se observa una pérdida de material del implante en las zonas periféricas del mismo, que dan lugar a imágenes en sacabocados, con una pérdida de material del implante en las zonas periféricas del mismo, que dan lugar a imágenes en sacabocados, con una superficie irregular en las zonas en contacto con las superficies óseas, adoptando una morfología bicóncava. Se observa igualmente, una aparente disminución generalizada de la densidad radiológica del implante.

B) Estudio microscópico óptico (Fig. 6)

Durante este período, a diferencia del anterior, observamos focos del material con intensa reacción macrofágica alrededor así como una progresiva de-

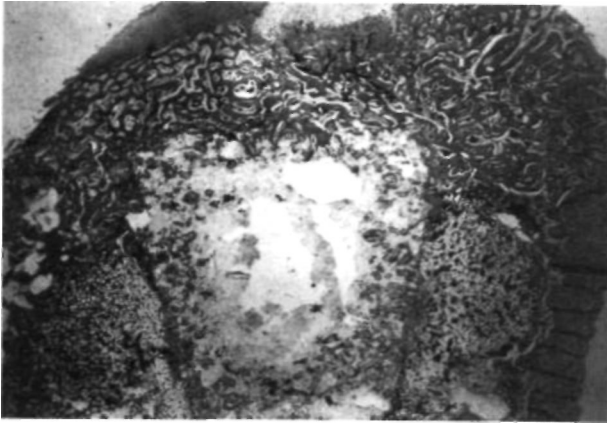


Figura 6. Imagen panorámica de la superficie de sección ósea con material implantado en la porción central. Hueso neoformado con trabéculas delgadas e irregulares introduciéndose desde la periferia en el material implantado. (Tricrómico de Masson, 125 X).

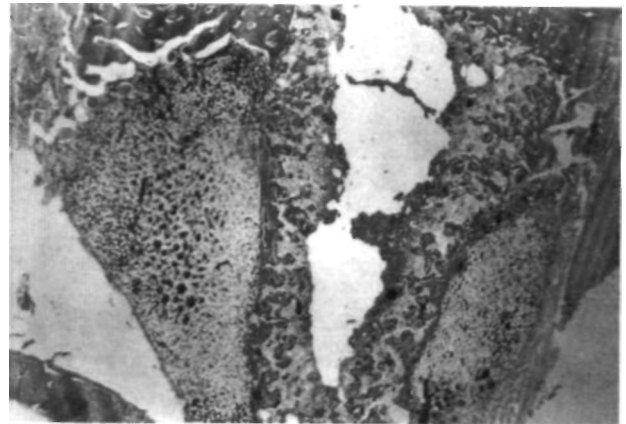


Figura 8. Imagen panorámica del área de sección ósea que incluye zona de implante con abundantes trabéculas neoformadas de pequeño tamaño que ocupan gran parte del implante. (Tricrómico de Masson, 125 X).

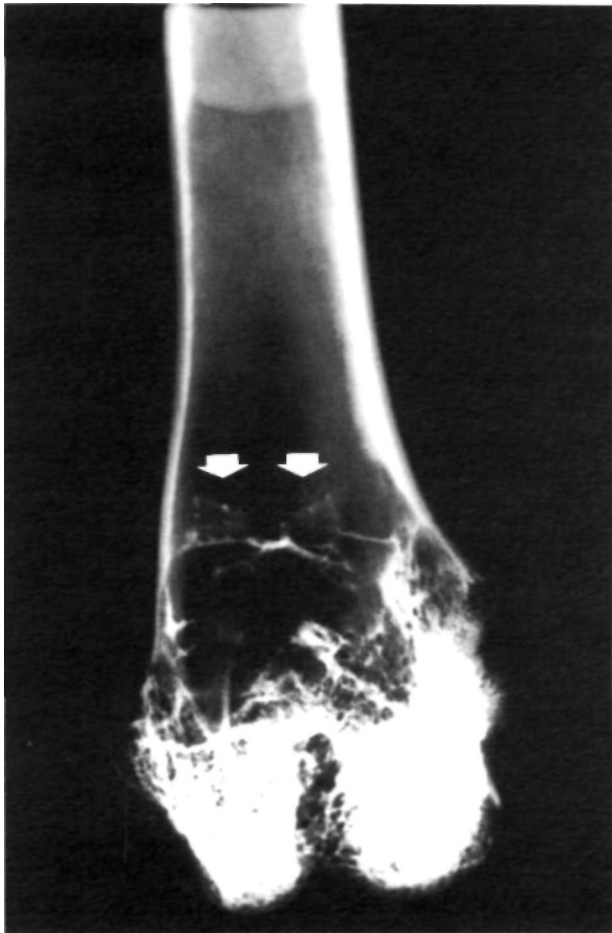


Figura 7. Proyección AP del extremo distal del fémur. El implante presenta una disminución de tamaño, más intensa en su zona central presentando una imagen en «reloj de arena» de contornos muy irregulares (flechas).

saparición del material implantado, tanto en la porción central como periférica, el cual se encuentra sustituido por tejido óseo neoformado. Encontrándose la mayor parte del material en íntimo contacto con el hueso neoformado como se observa de forma más detallada con la técnica de tricrómico de Masson.

III. Grupo de animales con implante de dos meses de evolución

A) Estudio radiológico (Fig. 7)

La morfología del implante ha variado de forma importante presentando: disminución de la densidad radiológica inicial, mayores irregularidades en su contorno (imágenes en sacabocados), y una mayor reabsorción o desaparición del implante que presenta menor diámetro (espesor) más intensa en la zona media del implante, dando como resultado una morfología en «reloj de arena». Se observan imágenes trabeculares óseas que desde el hueso adyacente cruzan la laguna ósea donde se encuentra el implante.

B) Estudio microscópico óptico (Fig. 8)

Lo característico en las secciones correspondientes a este período, es la mayor reabsorción del material, sobre todo en su porción central, y sus sustitución por hueso trabecular neoformado que llega a establecer enlaces desde los extremos con el hueso periférico. Es frecuente observar macrófagos rodeando a los depósitos, que están constituidos por pequeños acúmulos granulares ligeramente eosinófilos.

IV. Grupo de animales con implante de cuatro meses de evolución

A) Estudio radiológico (Fig. 9)

En este período, las imágenes radiológicas muestran la práctica desaparición del implante, apareciendo en su lugar imágenes radiológicas de densidad calcio, en donde es posible apreciar la presencia de trabéculas óseas que cruzan la zona en la que estuvo situado el implante; el composite parece haber sido sustituido por hueso que radiológicamente es de características normales. La trabeculación ósea adyacente al implante, tanto proximal como distal, persiste sin pérdida de su distribución normal y sin alteraciones óseas significativas.

B) Estudio microscópico óptico (Fig. 10)

En las imágenes panorámicas resulta difícil reconocer los depósitos del material implantado, puesto que son escasos al estar sustituidos en su mayor parte por trabéculas óseas neoformadas. No obstante

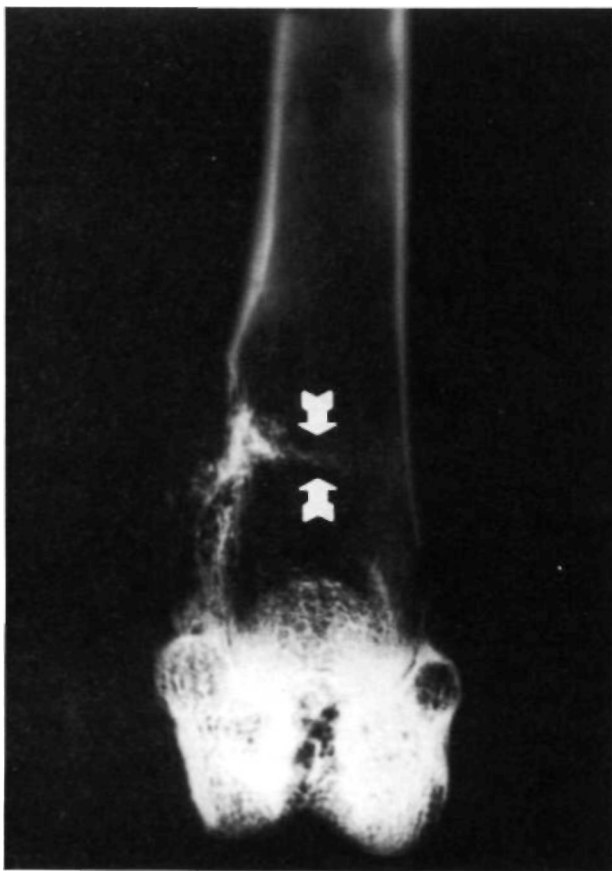


Figura 9. Proyección AP del extremo distal del fémur. Imagen del implante a los cuatro meses de evolución en la que se observan escasos restos del mismo (flechas).

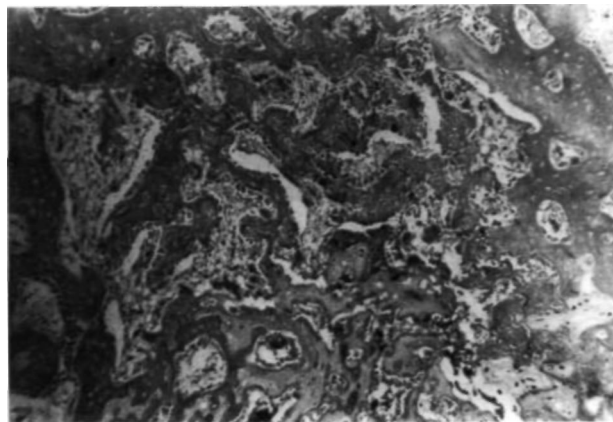


Figura 10. Imagen panorámica del área de sección que incluye la zona de implante, que muestra la total sustitución del material implantado por tejido óseo trabecular inmaduro y médula ósea hematopoyética. (Tricrómico de Masson. 125 X).

los focos de β -FTC-C aún existentes, se encuentran rodeados de reacción macrofágica. En las porciones periféricas se encuentra hueso neoformado, mientras que en la porción central predominan áreas de médula ósea entre acúmulos de β -FTC-C.

V. Grupo de animales con implante de 12 meses de evolución

A) Estudio radiológico (Fig. 11)

Es característico en esta fase final del estudio la total ausencia del material implantado, observándose en su lugar, neoformación ósea trabecular que rellena dicho espacio. Tampoco se observan reacciones corticales externas que hayan dado lugar a crestas óseas o exostosis, así como, imágenes osteodensas reactivas en el tejido óseo circundante al implante, ni signos de movilización intraósea del mismo.

B) Estudio microscópico óptico (Fig. 12)

Los depósitos de material han desaparecido casi en su totalidad, quedando reducidos a pequeños y aislados acúmulos rodeados de células gigantes multinucleadas, separados ampliamente por tejido óseo trabecular de características normales, con un tapizamiento osteoblástico continuo y con médula ósea hematopoyética entre las trabéculas.

DISCUSIÓN

En relación con el perfil biológico de estas cerámicas de FC, va surgiendo de forma continua infor-

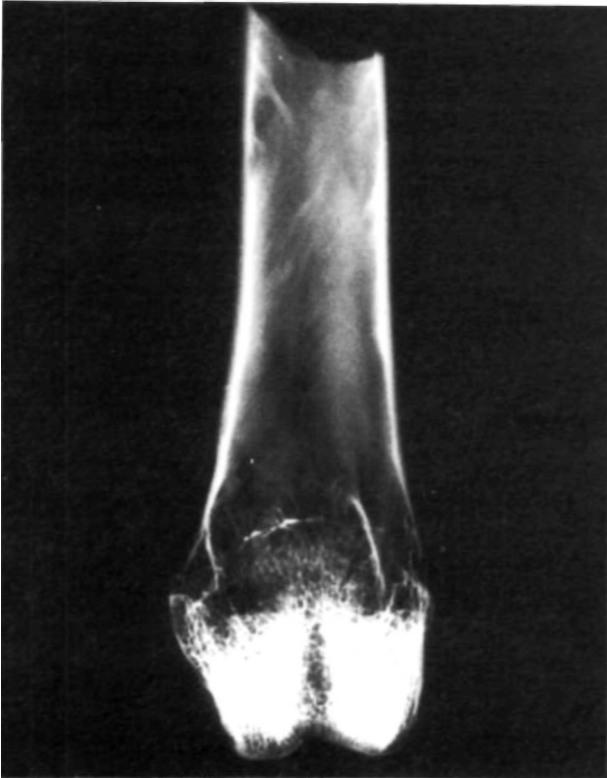


Figura 11. Imagen radiológica obtenida a los 12 meses en la que se muestra la total ausencia del material implantado.

mación al respecto debido a los esfuerzos acelerados para desarrollar materiales para implantes. Existe pues, un perfil básico que incluye la ausencia de toxicidad local o sistémica, la ausencia de respuesta inflamatoria intensa y mantenida a cuerpo extraño, ausencia de formación de tejido fibroso entre implante-hueso y, sobre todo, la aparente capacidad de unirse directamente al hueso por medio de unos mecanismos que demuestran ser una cimentación o unión natural, tal como hemos podido observar en estudios previos (19).

No hemos encontrado en las referencias bibliográficas consultadas, la aplicación de estas técnicas mamográficas en los estudios radiológicos de las muestras obtenidas en los diferentes períodos del estudio para controlar la evolución del proceso de reabsorción del implante. Si bien este mecanismo aún no está del todo claramente definido, la fragmentación del material y la presencia de partículas en el interior de las células multinucleadas próximas al implante, hace pensar que éste se lleve a cabo mediante un proceso fagocítico (12, 19, 23), nuestro estudio parece apoyar esta hipótesis al haber observado una reacción macrofágica progresiva durante la primera parte del mismo, que fue seguida de disminución también progresiva, con desapa-

rición casi absoluta al final del período de tiempo estudiado, siendo sustituido por tejido óseo trabecular de características normales. Estas observaciones coinciden con la pérdida de densidad radiológica y el cambio de morfología del implante, a partir del primer mes, que coincide con la mayor presencia de células de estirpe macrofágica rodeando al material implantado, incluso en el interior del mismo, pudiendo observarse algunas de estas células con partículas de la cerámica en el interior de vesículas intracitoplasmáticas (19). Esta disminución que es más acentuada en las porciones centrales del implante, creemos al igual que Uchida et al. (12), que es debida a la influencia de la médula ósea próxima a la porción central del material.

Por otro lado, la continua presencia de células multinucleadas tanto en la periferia como en el interior del implante alternando con fenómenos de aposición ósea, nos hace pensar que estamos ante un proceso simultáneo de reabsorción-aposición ósea.

En lo que respecta a la interfase implante-hueso, el tejido óseo neofornado se deposita directamente sobre el material implantado, introduciéndose entre los poros desde la periferia de forma progresiva con relleno del defecto óseo a partir del cuarto mes, coincidiendo con las observaciones de Rejda (23) y Sedel (21).

La remodelación del tejido óseo neofornado muestra las características habituales, con sustitución de la práctica totalidad de los materiales implantados por tejido óseo trabecular de morfología normal durante el período de estudio.

Así pues, las imágenes obtenidas con la aplicación de métodos radiológicos y en concreto con la

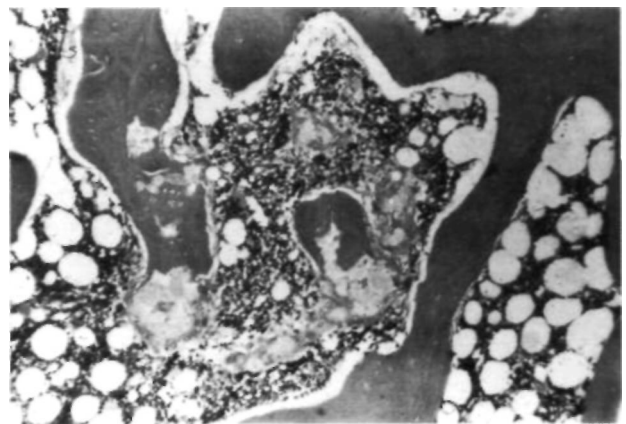


Figura 12. Ausencia del material implantado. Detalle de las trabéculas óseas neofornadas con revestimiento osteoblástico continuo. (Tricrómico de Masson. 312,5 X).

aplicación de técnicas mamográficas, concuerdan con los hallazgos anatomopatológicos en cada una de las fases del estudio.

Del mismo modo este estudio nos ha permitido observar la existencia de trabeculación ósea dispuesta u orientada según la dirección de las líneas de carga que contactan estrechamente con la superficie del implante (interfase).

Creemos que este tipo de procedimientos es más fiable que la radiología simple convencional al poder obtener imágenes más precisas y detalladas de la trabeculación ósea, su orientación, detección de líneas radiolúcidas, reacciones óseas, etc. caracterizándose por ser una técnica precisa para el control evolutivo del proceso de reabsorción del implante.

Bibliografía

1. Levin MP, Getter L, Cutright DE, Bhaskar SN. Biodegradable ceramics in periodontal defects. *Oral Surg* 1974; 38: 344-50.
2. Koster K, Karbe E, Kramer II, Heide H. Experimental bone replacement with resorbable calcium phosphate ceramic. *Langenbecks Arch Chir* 1976; 341: 77-89.
3. Shima T, Keller JT, Alvira MM, Mayfield FH, Dunsker SB. Anterior cervical disectomy and interbody fusion: An experimental study using a synthetic tricalcium phosphate. *J Neurosurg* 1979; 51: 533-42.
4. Albee FH y Morrison HF. Studies in bone grown: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg* 1920; 71: 32-9.
5. Nystrom G. Plugging of bone cavities with Ravanol-plaster-porridge. *Act Chir Scandinav* 1928; 63: 296-305.
6. Edberg D. Some experiences of filling osseous cavities with plaster. *Act Chir Scaninav* 1930; 67: 313-9.
7. Peltier LF. The use of plaster to fill defects in bone. *Ann Surg* 1957; 146: 61-70.
8. Bhaskar SN, Brady JM, Getter L, Grower MF, Driskell T. Biodegradable ceramic implants in bone electron and light microscopic analysis. *Oral Surg* 1971; 32: 336-46.
9. Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. *J Biomed Mater Res* 1971; 2: 161-229.
10. Getter L, Cutright DE, Bhaskar SN, Augsburg JK. A biodegradable intraosseous appliance in the treatment of mandibular fractures. *Oral Surg* 1972; 30: 344-8.
11. Collins Th. Use of collagen tubes containing particulate hydroxyapatite for augmentation of the odontolous atrophic maxilla. *J Oral Maxillofac Surg* 1989; 47: 137-41.
12. Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W. Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits. *J Orthop Res* 1985; 3: 61-5.
13. Daeulsi G, Hartman DJ, Heughebaert M. In vivo cell interactions with calcium phosphate bioceramics. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1988; 20: 379-84.
14. Driessen AA, Klein CPTA, De Groot K. Preparation and some properties of sintered B-Whitlockite. *Biomaterials* 1982; 3: 113-5.
15. Palacios-Carvajal J, Moina EM. The mixture of fibrin sealant and a porous ceramic as osteoconductor: An experimental study. *Traumatology-Orthopaedics* 1986; 7: 189-97.
16. Gatti AM, Zaffe D, Poli GP. Behaviour of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects. *Biomaterials* 1990; 11: 513-7.
17. Klein CPAT, De Groot K, Driessen AA, Van Der Lubbe HBM. Interaction of biodegradable B-Whitlockite ceramics with bone tissue: An in vivo study. *Biomaterials* 1985; 6: 189-92.
18. Thomas MB, Doromeus RH, Jarcho M, Salisbury RL. Dense hydroxyapatite: Fatigue and fracture strength after various treatments. *J Mater Sci* 1980; 15: 891-9.
19. Meseguer Olmo LR. Respuesta biológica del hueso a las cerámicas de B-FTC. Comunicación XXIX Congreso S.E.C.O.T. Granada, 1992.
- 19-b. Meseguer Olmo LR. Respuesta biológica iniciada por el composite B-FTC-C. Comunicación XXX Congreso S.E.C.O.T. Barcelona, 1993.
20. De Groot K. Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption and strength of calcium phosphate ceramics. *Ann NY Acad Sci* 1988; 523: 227-33.
21. Sedel L. Etude de la resorption et de la rehabilitation de granules de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite implantés en apposition mandibulaire chez le chien. Monographic Ceraver, 1991.
22. Hubbard W. Physiological calcium phosphate as orthopedic biomaterials. PhD Tesis, Marquette University, 1974.
23. Rejda BV, Peelen JGJ, De Groot K. Tricalcium Phosphate as a bone substitute. *J Bioeng* 1977; 1: 93-7.
24. Jarcho M, Salisbury RL, Thomas MB, Doremus RH. Synthesis and fabrication of B-tricalcium phosphate (Whitloquite) ceramics for potential prosthetic applications. *J Materials Science* 1979; 14: 142-50.
25. Parson JR. Resorbable materials and composites. New concepts in orthopedic biomaterials. *Orthopedics* 1985; 8: 907-15.