

Síntesis y análisis de la biocompatibilidad y osteoconductividad de un composito hidroxiapatita/colágeno, implantado en el sacro de un perro

Enrique Martínez Ramírez*
Alejandro Quiroz Garcés**
René Velasco Villareal**
Guillermo de la Rosa Orea*
Manuel González Pérez*

* Postgrado en Ingeniería Biomédica, UPAEP.
** Clínica Veterinaria la Paz.

Correspondencia:
Manuel González Pérez.
manuel.gonzalez@upaep.mx
Universidad Popular Autónoma del Estado de
Puebla (UPAEP)
21 Sur 1103, Col. Santiago (72410)
Puebla, Puebla.
Tel. 01 2222299400 Ext. 7672
Cel. (045) 2221369107

Artículo recibido: 05/febrero/2011
Artículo aceptado: 19/noviembre/2011

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medigraphic.com/ingenieriabiomedica>

RESUMEN

Se sintetizó un nuevo biomaterial mediante el método de precipitación húmeda con el fin de obtener un injerto óseo capaz de utilizarse en aplicaciones médicas. Se preparó una solución de CaCl_2 198 mM y una solución 119 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ con agua destilada; ambas soluciones se mezclaron simultáneamente mientras que una solución de NH_4OH era agregada lentamente mediante goteo, finalmente se agregaron 3 ml de colágeno. El precipitado obtenido fue lavado varias veces con agua destilada, filtrado y secado en una incubadora a 40 °C. Las muestras fueron caracterizadas mediante difracción de rayos x (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR). Se prepararon tres cubos de composito de 10 x 10 x 10 mm³ cada uno, y fueron implantados en el sacro de un perro hembra para comprobar osteointegración y biocompatibilidad, se realizaron estudios histológicos y radiográficos que mostraron el desarrollo de un callo óseo y la formación de hueso nuevo.

Palabras clave: Hidroxiapatita, colágeno, injerto óseo.

ABSTRACT

A new material was synthesized using the wet precipitation method to obtain an osseous insert that can be used in medical applications. A solution of CaCl_2 198 mM and another one with 119 mM of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dissolved in distilled water were simultaneously prepared with the slowly and continuous addition of NH_4OH dissolved in water. Finally, 3 ml of collagen was aggregated to the solution. The precipitated was washed out several times with distilled water, filtered and dried in an incubator at 40 °C. The samples were characterized by X-ray diffraction, surface electronic microscopy, Fourier transformation based infrared spectroscopy. Three different cubes composites with the volume of 10 x 10 x 10 mm³ each one were prepared and implanted into the dog's sacrum of a female dog to check the osseous integration and the biocompatibility of the new material. Histological and radiographic studies were developed showed the development of osseous callus and the consequent formation of new bone section.

Key words: Hydroxyapatite, collagen, osteon insert.

INTRODUCCIÓN

El interés por las cerámicas se ha incrementado dramáticamente desde hace más de dos décadas; a un punto en donde son indispensables tanto en tratamientos ortopédicos¹, aplicaciones dentales^{2,15} y otros campos muy amplios de la medicina en general^{3,4}. En el área dental las cerámicas se han utilizado con gran éxito para la creación de implantes y pegamentos para la fijación de prótesis^{2,5}. Por otro lado, una gran aplicación que se les ha dado es el recubrimiento de metales que son implantados como soportes de fracturas para mejorar la biocompatibilidad y la adherencia de células⁶. Algunas cerámicas se producen de manera especial para resistir condiciones extremas de temperatura o degradación en presencia de líquidos corrosivos sin presentar deficiencias mecánicas o deformación por un largo periodo de tiempo^{7,8}.

La hidroxiapatita (Hap) es una cerámica policristalina⁹ de fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tiene una forma de fosfato cálcico¹⁰ que posee la misma composición química del hueso humano, dicha característica la ha convertido en un material sumamente importante para la creación y recubrimiento de prótesis capaces de tener la

misma bio-funcionalidad de un hueso natural; sin embargo, ésta por sí sola carece de resistencia y sus propiedades mecánicas no permiten que sea utilizada directamente como un implante, es por eso que la creación de composites cuya estructura está conformada por materiales orgánicos e inorgánicos^{11,12} juega un papel importante para la creación de prótesis capaces de soportar las duras condiciones^{7,8,13} de los sistemas biológicos.

Se ha estudiado una gran cantidad de materiales en el área de ingeniería de tejidos, especialmente para la regeneración de tejido óseo incluyendo materiales naturales y sintéticos¹⁴⁻¹⁶. El colágeno¹⁴ es ampliamente utilizado como biomaterial, ya que mejora la biocompatibilidad de los sistemas en los que se usa, al brindar mayor similitud con los tejidos del cuerpo.

El planteamiento teórico por medio de simulación molecular computarizada de reacciones químicas y bioquímicas¹⁷, se ha aplicado con mucha frecuencia con el fin de ahorrar tiempo y recursos económicos que generalmente se gastaban en los métodos de prueba y error¹⁸⁻²¹.

En este estudio se preparó un biomaterial a base de hidroxiapatita/colágeno^{22,23}. La reacción de síntesis fue estudiada en el simulador molecular HYPERCHEM, el cual posee los métodos cuánticos como el semi-empírico, métodos de la mecánica molecular como el AMBER 3, con los cuales es posible determinar propiedades como la polaridad, energía libre de Gibbs, campos electrostáticos, y la optimización de la geometría de las moléculas en cuestión y así predecir condiciones de experimentación.

Las muestras obtenidas fueron caracterizadas mediante difracción de rayos x (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR). Para analizar la biocompatibilidad y osteoconductividad se realizaron pruebas biológicas, la implantación del injerto se realizó en la región sacro de un perro hembra de 10 años y 3 kg de peso, estudios radiográficos e histológicos permitieron observar la

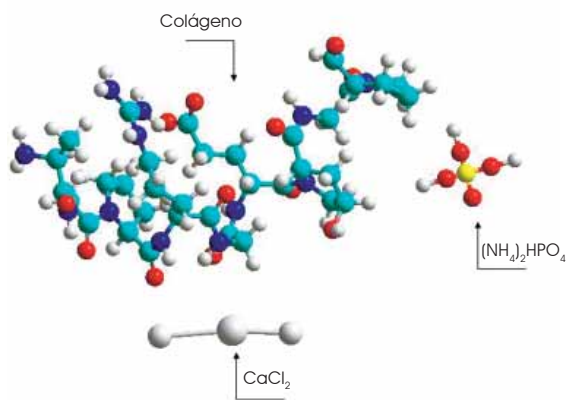


Figura 1. Interacción entre las tres moléculas de los reactivos principales para obtener el compuesto Hap/colágeno.

www.medigraphic.org.mx

Cuadro 1. Energías y polaridades obtenidas por simulación en el software HYPERCHEM.

Compuestos	Energía libre de Gibbs	Polaridad	Semi-empirical
CaCl_2	-15,268.7500	0.04431	PM3
Colágeno	-7,492.6904	1.73800	PM3
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	-5,392.9843	9.71700	PM3
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + \text{colágeno} + \text{CaCl}_2$	-45,628.1132	9.42600	PM3

formación de un callo óseo cubriendo el implante por completo; este callo es una porción orgánica de la matriz ósea y se forma antes de la maduración del hueso²⁴ e indica la consolidación de una fractura.

PARTE EXPERIMENTAL

Simulación molecular

La simulación molecular es una poderosa herramienta para analizar una reacción química, nos permite saber si la reacción se llevará a cabo o no al analizar la energía total del sistema. La Figura 1 muestra la interacción de las tres moléculas dibujadas en la pantalla principal del programa HYPERCHEM, de los reactivos principales; este software calcula la energía total del sistema, polaridad, campos electrostáticos, entre muchas propiedades más que permiten determinar todos los parámetros necesarios para llevar a cabo una reacción química. En el Cuadro 1 se puede apreciar que la interacción de las tres moléculas presenta una energía mucho más negativa con respecto a las energías individuales de cada reactivo, lo que nos indica que el sistema tiende a ser más estable y por consiguiente que una reacción se efectuará.

Síntesis del compuesto de hidroxiapatita/colágeno

El compuesto de hidroxiapatita/colágeno^{22,23} fue sintetizado por el método de precipitación húmeda, usando CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4OH y atelocolágeno. Se preparó una solución de CaCl_2 198 mM y una solución 119 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ con agua destilada; ambas soluciones fueron mezcladas simultáneamente, mientras que una solución de NH_4OH era agregada lentamente mediante goteo, finalmente se agregaron 3 ml de colágeno. El precipitado obtenido se lavó varias veces con agua destilada, filtrado y secado en una incubadora a 40 °C, las muestras fueron caracterizadas mediante difracción de rayos x (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR).

Caracterización

Difracción de rayos x DRX

La Figura 2 muestra el patrón de DRX del compuesto de hidroxiapatita/colágeno, en el cual se pueden

ver los picos característicos 26.5, 28.5, 31.4, 32.7, 34.5, 39.3°, en la escala 2-theta debido a la estructura de la hidroxiapatita cristalina sintetizada, estos valores son similares a los del biomaterial a base de titanio/hidroxiapatita a 26, 28, 31.9, 32.3, 33, 34.2, 39.9.

Análisis FT-IR

En la Figura 3 se muestran los enlaces orgánico-inorgánicos entre la fase de Hap y la matriz de colágeno gracias a las bandas de amidas presentes: amida I en el rango 1640-1760 y las bandas para amida II en el rango 1644-1550. El estiramiento del grupo fosfato se puede encontrar en el rango de 1100-900 e indica la existencia de una fase apatita. En la preparación del compuesto la fase apatita precipitada está envuelta en la matriz de colágeno a través de la interacción covalente entre los iones de Ca^+ de la apatita y los iones R-COO^- de las moléculas de colágeno.

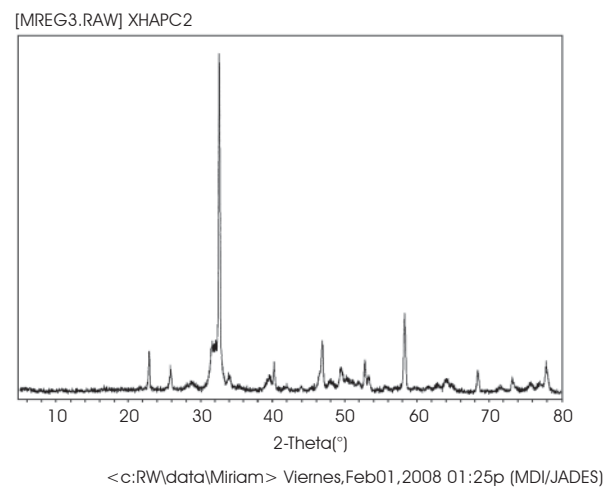


Figura 2. Espectro de difracción de rayos x del compuesto Hap/colágeno.

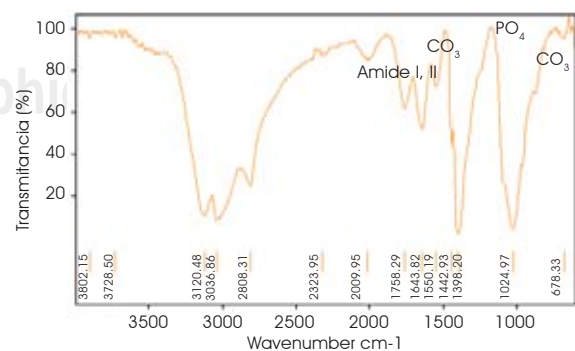


Figura 3. Espectro FT-IR del compuesto Hap/colágeno.

SEM

La micro-fotografía SEM, en la Figura 4, muestra la superficie de la muestra seca. Puede observarse la aglomeración de pequeños agregados, los cuales están compuestos de partículas de hidroxiapatita envueltas en matrices de colágeno.

Biocompatibilidad y osteoconductividad del compoisto Hap/colágeno *in vivo*

Material y métodos

Se moldearon tres cubos con un tamaño de 10 x 10 x 10 mm³. El perro fue sedado por la administración intravenosa de butorfanol (0.2 mg/kg) y midazolam (0.02 mg/kg). La anestesia se logró administrando propofol (3 mg/kg), y se mantuvo con 2% de isoflurano en oxígeno administrado a través de un tubo endotraqueal (Figura 5).

Como se ve en la Figura 6, se realizó una fractura en el sacro del perro y tres piezas del injerto sintetizado se colocaron en la zona.

Resultados

Se realizaron estudios radiográficos cada mes con el fin de observar la respuesta al material, la Figura 7, muestra que después de un mes de haber implantado el injerto se observa la formación de un callo óseo debido a la proliferación de células en la superficie del injerto, para el segundo mes el callo reduce su tamaño, esto se debe principalmente al

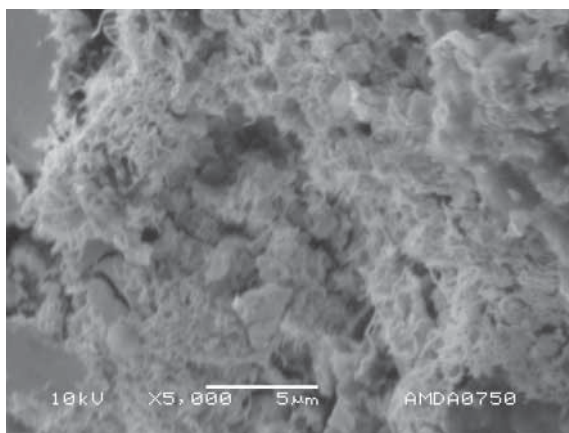


Figura 4. Micro-fotografía SEM de la muestra Hap/colágeno, la escala indica 5 µm. Los granos pequeños (0.5 µm de tamaño) corresponden a los agregados de las partículas precipitadas envueltas en matrices de colágeno.

proceso de remodelación llevado a cabo por las células. Este proceso de remodelación continúa hasta el cuarto mes en el cual la fractura sana completamente.

Análisis histológico

Las secciones teñidas con hematoxilina-eosina muestran, en la Figura 8, un fragmento de tejido óseo maduro en corte transversal cubierto por periostio y compuesto de hueso compacto en el que se identifican conductos de Havers rodeados por láminas concéntricas en las que se observan lagunas y láminas intersticiales dividiendo los conductos. Además se observa hueso esponjoso constituido por numerosas trabéculas óseas en las que se identifican numerosas lagunas ocupadas por osteocitos formando la matriz ósea. Las trabéculas óseas están separadas por cavidades medulares en las que se observan células sanguí-



Figura 5. Cirugía del implante de HA/colágeno en el perro.

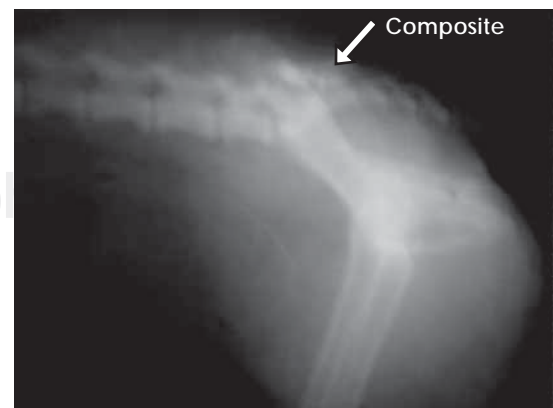


Figura 6. Implante del injerto sintetizado en la zona sacro perro.

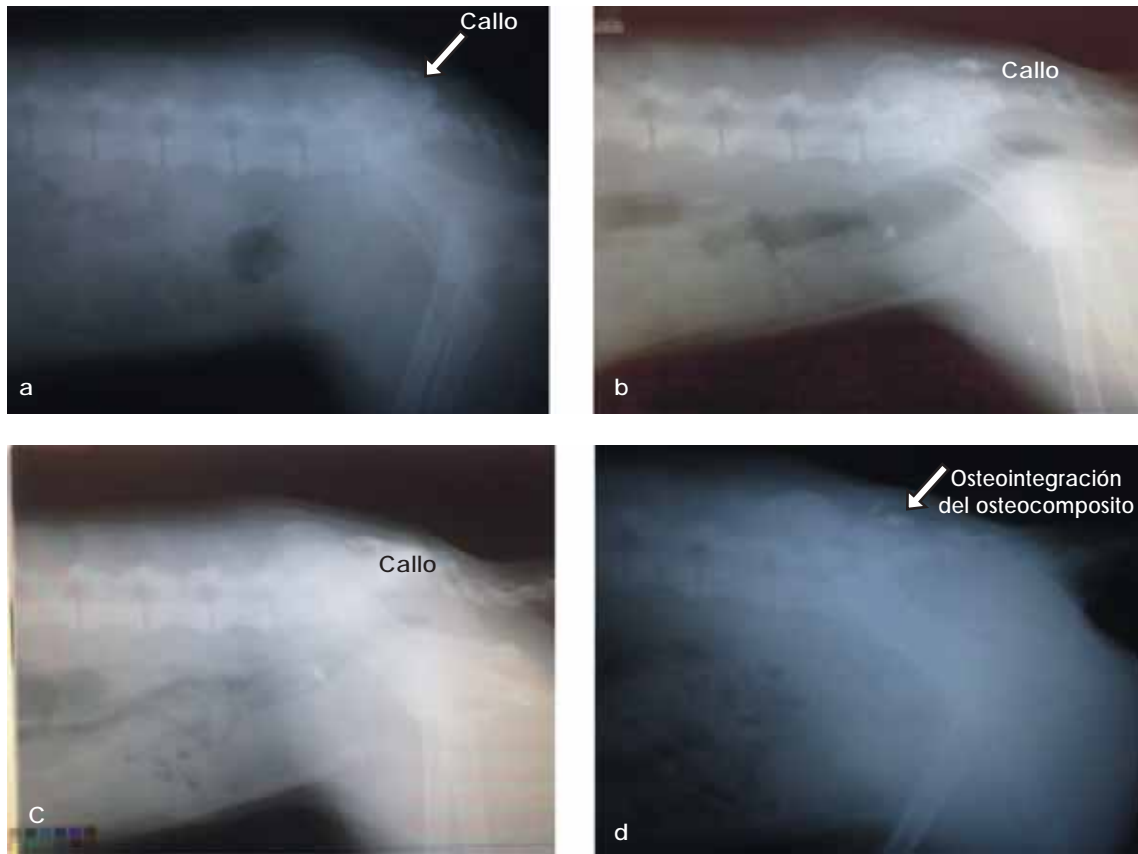


Figura 7. Las imágenes describen el proceso de remodelación y el proceso de osteoconductividad y biocompatibilidad (a) en el primer mes de implantación, (b) segundo mes, (c) tercer mes y finalmente en (d) la osteointegración del compuesto.

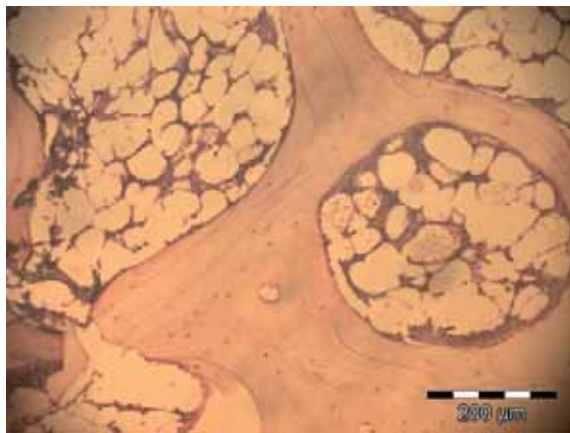


Figura 8. Corte histológico de la zona de hueso nuevo.

neas libres en diferentes etapas de maduración sin que se identifiquen tipos celulares individuales. No se observan osteoblastos ni osteoclastos rodeando las trabéculas que sugieran cavidades

de resorción ósea, ni células inflamatorias en ninguna sección. Hacia la periferia se observan cúmulos de tejido adiposo y fibras de músculo estriado en corte longitudinal de características normales.

CONCLUSIONES

Se sintetizó un compuesto a base de hidroxiapatita/colágeno usando el método de precipitación húmeda, las muestras fueron caracterizadas por FT-IR, DRX y SEM. Los espectros de difracción de rayos x muestran la estructura cristalina de la hidroxiapatita. Los estudios de FT-IR muestran la formación de una fase apatita interactuando con el grupo amina de la matriz de colágeno

Se llevaron a cabo pruebas biológicas para examinar la biocompatibilidad y osteoconductividad. Los estudios radiográficos muestran la formación de un callo óseo después de un mes de haber implantado las muestras, al cabo de cuatro

meses se puede observar la formación de hueso nuevo y la regeneración de la fractura.

Este biomaterial mostró tener buena biocompatibilidad ya que no se presentó infección ni respuesta inflamatoria. Deben realizarse más pruebas para determinar si este material puede ser utilizado para la regeneración de fracturas más severas y en muchas otras aplicaciones medicas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos sinceramente al Centro de Servicios de Alta Tecnología (CSAT) UPAEP, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Clínica Veterinaria la Paz. *Diagnóstico clínico e histopatológico*, Dra. Adriana Martínez Hernández.

REFERENCIAS

- Landor I, Vavrik P, Sosna A, Jahoda D, Hahn H, Daniel M. Hydroxyapatite porous coating and the osteointegration of the total hip replacement. *Arch Orthop Trauma Surg* 2007; 127: 81-89.
- Gillespie MB, Dozier TS, Day TA, Blair J, Martine-Harris B, Nguyen SA. Effectiveness of calcium hydroxyapatite paste in vocal rehabilitation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009; 118: 546-551.
- Ren J, Zhao P, Ren T, Gu S, Pan K. Poly (D, L-lactide)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering and biocompatibility evaluation. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 1075-1082.
- Arvanitis P, Stratoudakis A, Alexandrou C. Secondary orbital implant insertion in an anophthalmic patient after orbital reconstruction. Copyright c 2007 Informa Healthcare USA, Inc. ISSN: 0167-6830 DOI: 10.1080/01676830601168967. *Orbit* 2007; 26: 275-277.
- Stübinger S, Ghanaati S, Orth C, Hilbig U, Saldamli B, Biesterfeld S, Kirkpatrick CJ, Sader RA. Maxillary sinus grafting with a nano-structured biomaterial: preliminary clinical and histological results. *Eur Surg Res* 2009; 42:143-149.
- Abe T, Anan M, Kamida T, Fujiki M. Surgical technique for anterior skull base reconstruction using hydroxyapatite cement and titanium mesh. *Acta Neurochir* 2009; 151: 1337-1338.
- Mazzocchi M, Bellos A. On the possibility of silicon nitride as a ceramic for structural orthopaedic implants. Part I: processing, microstructure, mechanical properties, cytotoxicity. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 2881-2887.
- Mazzocchi M, Gardini D, Traverso PL, Faga MG, Bellosi A. On the possibility of silicon nitride as a ceramic for structural orthopaedic implants. Part II: chemical stability and wear resistance in body environment. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 2889-2901.
- Sánchez-Pastenesa E, Reyes-Gasgab J. Determination of the point and space groups for hydroxyapatite by computer simulation of CBED electron diffraction patterns. *Revista Mexicana de Física* 2005; 51 (5): 525-529.
- Medina HL, Thackray AC, Jones IP, Marquis PM, Macaskie LE, Sammons RL. Microstructure and composition of biosynthetically synthesized hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 3419-3427.
- Byong-Taek L, Do Van Quang, Min-Ho Y, Ho-Yeon S. Fabrication of biphasic calcium phosphates/polycaprolactone composites by melt infiltration process. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 2223-2229.
- Shing-Chung W, Avinash B. Fracture strength and adhesive strength of hydroxyapatite-filled. *J Mater Sci: Mater Med* 2008; 19: 929-936.
- Polycaprolactone. <http://designinsite.dk/htmlsider/m0954.htm>.
- Stadlinger B, Pilling E, Mai R, Bierbaum S, Berhardt R, Scharnweber D, Eckelt U. Effect of biological implant surface coatings on bone formation, applying collagen, proteoglycans, glycosaminoglycans and growth factors. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 1043-1049.
- Stübinger S, Ghanaati SBC, Orth BU, Hilbig B, Saldamli S, Biesterfeld CJ, Kirkpatrick RA. Sader. maxillary sinus grafting with a nano-structured biomaterial: preliminary clinical and histological results. *Eur Surg Res* 2009; 42: 143-149.
- Itoh S, Nakamura S, Nakamura M, Shinomiya K, Yamashita K. Enhanced Bone regeneration by electrical polarization of hydroxyapatite. Blackwell Publishing, Inc ©. *Artificial Organs* 2006; 30(11): 863-869.
- Dilek Unal, Emin Saripinar, Yunus Akc, Amur. A new method for the preparation of pyridazine systems: Experimental data and semiempirical PM3 calculations. *Turk J Chem* 2006; 30: 691-701.
- Zhou Y, Xie D. Three-dimensional ab initio potential-energy surface and rovibrational spectra of the H₂-Kr complex. *The Journal of Chemical Physics* 2005; 123: 134323.
- Pak VV, Ku M, Li N, Kim MS, Kasymova TD, Kwon DY. Structures of the peptide Leu-Pro-Tyr-Pro and its derivatives and the nicotinamide part of nadph by a semi-empirical PM3 method. *Chemistry of Natural Compounds* 2005; 14(1).
- Khandelwal A, Balaz S. Improved estimation of ligand-macromolecule binding affinities by linear response approach using a combination of multi-mode MD simulation and QM/MM methods. *J Comput Aided Mol Des* 2007; 21: 131-137.
- Kienle D, Bevan KH, Liang GC, Siddiqui L. Extended Hückel theory for band structure, chemistry, and transport. II. Silicon. *Journal of Applied Physics* 2006; Vol. 100 No 4. Pp 3715-3723.
- Lingrong Lui, Lihai Zhang, Baizhi Ren, Fujum Wang, Qiying Zhang. Preparation and characterization of Collagen-Hydroxyapatite composite used for bone tissue engineering scaffold. *Art Cell Boold Subst and Biotech* 2003; 4(31): 435-448.
- Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Matumoto HN, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J. Development of a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite for medical use. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2005; 15: 29-41.
- Rumpel E, Wolf E, Kauschke E, Bienengraber V, Bayerlein T, Gedrange T, Proff P. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes *in vivo*. *Folia Morphol (Warsz)*. 2006 Feb;65(1):43-48.