Análisis histológico del comportamiento de dos sustitutos óseos en cavidades críticas realizadas en la calota de la rata. Un estudio piloto

Histological analysis of two bone grafting materials in critical-sized cavities performed in the rat calvaria. A pilot study

Presentado: 19 de septiembre de 2012
Aceptado: 8 de enero de 2013

Carla Goroni[a], Gabriel Kokubu[a], Daniel Grana[a†], Osvaldo Zmener[a], Martín Cornut[b], Andrés Osols[c]

[a]Cátedra de Anatomía Patológica, Escuela de Odontología, Universidad del Salvador/Asociación Odontológica Argentina

[b]Cátedra de Histología, Escuela de Odontología, Universidad del Salvador/Asociación Odontológica Argentina

[c]Departamento de Física, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires

Resumen

Objetivo: Observar histológicamente el efecto de dos materiales utilizados como sustituto óseo, en defectos críticos circulares producidos en la calota de la rata.

Materiales y métodos: Se realizó una osteotomía en la calota de ocho ratas Wistar, separadas en dos grupos (A y B) de cuatro (n=4) animales cada uno, con el objeto de crear defectos críticos, que posteriormente fueron rellenados con dos sustitutos óseos. En el Grupo A se utilizó el producto comercial Osteodens®, a base de un granulado obtenido de hueso bovino molido y calcinado; mientras que en el Grupo B se empleó un preparado experimental compuesto por un granulado de hidroxiapatita obtenido a partir de hueso bovino, con el agregado de fosfato tricálcico. Los animales de ambos grupos fueron sacrificados a los 60 días posoperatorios. Las calotas fueron descalcificadas e incluidas en parafina, y se obtuvieron secciones semiseriadas, las cuales fueron coloreadas alternativamente con hematoxilina-eosina o tricrómico de Masson.

Resultados: Luego de 60 días, en ambos grupos, se observó una trama colágena que rodeaba las partículas del relleno, sin formación de tejido óseo.

Conclusión: Los hallazgos sugieren que ambos materiales investigados presentaron comportamientos similares, y no se observó el desarrollo de nuevas trabéculas óseas dentro de los defectos óseos creados.

Palabras clave: Cirugía endodóntica, hueso bovino, injerto óseo, regeneración ósea.

Abstract

Aim: *To investigate the effect of two bone grafts materials implanted in critical defects performed in the rat calvaria.*

Materials and methods: *Osteotomies were made in the calvaria of eight Wistar rats to create critical defects. The rats were divided into two groups (A and B) of four animals each (n=4). The defects in Group A were filled with the commercial product Osteodens®, while in Group B the defects were filled with an experimental hydroxyapatite/tricalcium phosphate aggregate material. Animals in both groups were euthanized after 60 days and the calvarias were processed for histological observation. Semi serial sections were obtained and alternatively stained with hematoxylin and eosin or Masson trichrome.*

Results: *After 60 days, both groups revealed that the particles of the tested materials were totally surrounded by a healthy dense fibrous connective tissue with the absence of newly formed bone trabeculae.*

Conclusion: *The results suggest that both materials behaved similarly and did not allow new bone formation within the recipient sites.*

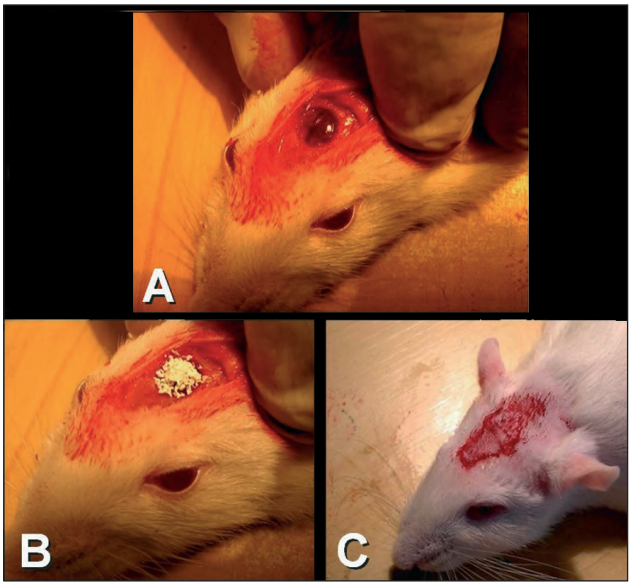
Key words: *Bone tissue regeneration, bone grafting materials, bovine bone mineral, surgical endodontics.*

Introducción

Desde hace ya varias décadas, se han venido utilizando diferentes materiales orgánicos e inorgánicos como sustitutos óseos, con el objeto de reparar o reconstruir áreas en las que se han perdido importantes cantidades de hueso. Para ser empleado con ese objetivo, este tipo de materiales debe poseer ciertas propiedades, tales como ser inmunológicamente inactivo, tener la capacidad de restaurar la forma y la función del tejido óseo perdido, estimular o servir de apoyo para el desarrollo de nuevas trabéculas óseas, ser fácil de esterilizar, y mantenerse estable durante largos períodos de tiempo. En ese sentido, el hueso autólogo ha sido considerado como el material ideal en virtud de su biocompatibilidad y su potencial como inductor para la reparación ósea[1], aunque su empleo suele presentar algunas desventajas, tales como la necesidad de una cirugía adicional para la obtención de la muestra de hueso que será utilizada como relleno, dolores posoperatorios en la segunda herida y diferentes grados de reabsorción[2]. El uso de materiales sintéticos tales como la hidroxiapatita (HA) y el fosfato tricálcico (PTC), utilizados como sustitutos óseos en áreas con grandes pérdidas de hueso y que no pueden repararse por sí solas (heridas críticas), ha sido probado en animales de experimentación[3-6] y en humanos[7-10], especialmente en el campo de la cirugía endodóntica, con diferentes grados de éxito[3,7-9,11]. El objetivo de este trabajo fue analizar el comportamiento de dos materiales: un compuesto experimental a base de HA obtenido a partir de hueso bovino calcinado con la adición de 40% de PTC (HA/PTC), y un preparado comercial de estructura porosa (OSTD), denominado Osteodens® (Pharmatrix, Div. Therabel Pharma S.A., Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina), obtenido por medio de la trituración y la calcinación de la matriz mineral de hueso bovino; ambos materiales empleados como sustitutos óseos en cavidades críticas realizadas en la calota de la rata. La hipótesis nula establece que los comportamientos de HA/PTC y OSTD son similares.

Materiales y métodos

El protocolo de este estudio fue previamente revisado y aprobado por la Comisión de Ética para la Investigación Científica de la Asociación Odontológica Argentina. Para este estudio piloto se utilizaron ocho ratas Wistar macho, de aproximadamente 250 g de masa, que fueron separadas en dos grupos (A y B) de cuatro (n=4) animales cada uno. Los animales fueron tratados según las normas ISO 10993-1-1992 e ISO 10993-2-1992[12,13], y los principios éticos de experimentación y las especificaciones para el cuidado y el uso de animales de laboratorio[14]. Fueron puestos en cuarentena durante los 7 días previos a los procedimientos quirúrgicos, a efectos de asegurar que se encontraran en óptimas condiciones de salud. La preparación de los materiales de relleno óseo y las maniobras quirúrgicas de implantación fueron realizadas bajo condiciones asépticas, de acuerdo con los siguientes procedimientos: luego de que los animales fueran anestesiados por medio de una dosis intraperitoneal de clorhidrato de ketamina (14 mg/kg) y acepromazina (10 mg/kg), la piel que recubre la zona fronto parietal de la calota fue rasurada y desinfectada con una solución de yodo/povidona al 10% (Phoenix SAIC, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, con un escalpelo, se realizó una incisión y un colgajo trapezoidal de aproximadamente 18 mm de longitud a través de la piel, dejando al descubierto el hueso parietal. Se removieron ambas corticales óseas y se preparó, a través del hueso esponjoso, una osteotomía de forma circular, de 5 mm de diámetro, mediante una fresa trefina a una velocidad de 5.000 rpm en un micromotor eléctrico bajo constante refrigeración, con suero fisiológico (Fig. 1). En todo momento, se procuró preservar la integridad de la duramadre y del tejido cerebral. En el Grupo A, las cavidades óseas fueron rellenadas con OSTD (tamaño de partícula: 250-1000 µm), mientras que en el Grupo B fueron rellenadas con HA/PTC (tamaño de partícula: 300-800 µm). Finalmente, los colgajos fueron reposicionados, y las heridas, suturadas con



Figuras 1. A: Fotografía clínica del procedimiento quirúrgico, donde se observa la osteotomía de 5 mm de diámetro practicada sobre la calota. B: Material de relleno ubicado en la cavidad. C: Colgajo reubicado y suturado.

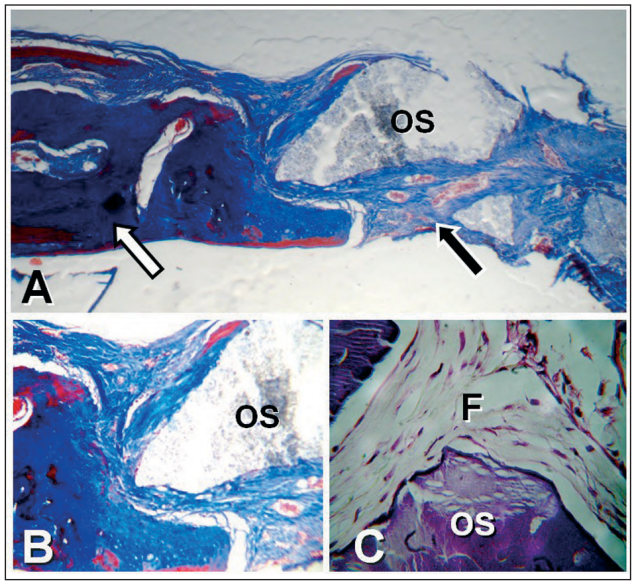


Figura 2. Microfotografía de un espécimen representativo del Grupo A. A: Partícula del material de relleno (OS) rodeada por tejido fibroso bien vascularizado (flecha negra), lindando con el tejido óseo que rodea la cavidad (flecha blanca) (tricrómico de Masson; magnificación original × 100). B: Mayor aumento de *A*, donde puede apreciarse el tejido fibroso que rodea la partícula de relleno (OS) (tricrómico de Masson; magnificación original × 400). C: Partícula de relleno (OS) rodeada por tejido fibroso (F), sin células inflamatorias (hematoxilina y eosina; magnificación original × 1000).

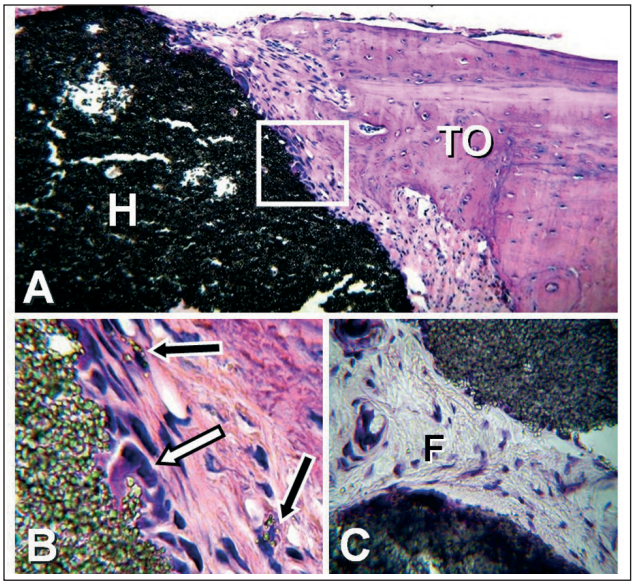


Figura 3. Microfotografía de un espécimen representativo del Grupo B. A: Relleno de hidroxiapatita (H) rodeado por tejido fibroso, lindando con el tejido óseo (TO) (hematoxilina y eosina; magnificación original × 100). B: Mayor aumento del área del recuadro en *A*. Las partículas de hidroxiapatita se encuentran rodeadas por tejido fibroso. Se observa una célula gigante multinucleada fagocitando partículas del material (flecha blanca) y partículas sueltas distribuidas en el tejido circundante (flechas negras) (hematoxilina y eosina; magnificación original × 1000). C: Tejido fibroso (F) entre dos conglomerados de hidroxiapatita (hematoxilina y eosina; magnificación original × 400).

cyanoacrilato. Se mantuvo a los animales en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador (USAL), en jaulas de acero inoxidable, con agua potable y alimento balanceado ad líbitum, a temperatura ambiental controlada (21 ± 5 °C) y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. A los 60 días posimplantación, fueron sacrificados por medio de una sobredosis de solución anestésica.

Posteriormente, las calotas fueron removidas quirúrgicamente (se conservó el tejido blando supraperiostal) y fijadas en solución de formol-buffer al 10% (pH 7,4). Luego de la fijación los especímenes se descalcificaron en ácido fórmico al 10%, se incluyeron en parafina y se procesaron para su evaluación histológica. Se obtuvieron secciones longitudinales semiseriadas de aproximadamente 7 µm de espesor a través del diámetro mayor del defecto óseo, las cuales fueron coloreadas alternativamente con hematoxilina y eosina o con tricrómico de Masson. Los cortes se analizaron y fotografiaron con diferentes aumentos por medio de un microscopio óptico equipado con una cámara digital Canon Powershot A510 (Canon, Tokio, Japón). Las imágenes fueron capturadas y analizadas mediante un software (Image Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos), con el que se evaluó el comportamiento de los sustitutos óseos utilizados, a fin de determinar si éstos fueron reabsorbidos y/o se produjo neoformación de trabéculas óseas.

Resultados

Luego de 60 días, se observó que todos los animales toleraron adecuadamente los procedimientos operatorios, que se encontraban en buenas condiciones de salud y que las heridas habían cicatrizado normalmente y no presentaban signos de infección. La palpación de la zona quirúrgica previa a la descalcificación de las calotas permitió comprobar que la superficie era firme y dura, lo cual sugería la presencia de nuevo tejido óseo. Sin embargo, la observación microscópica reveló que la dureza de la zona se debía a las partículas del relleno utilizado. Esta examinación permitió además diferenciar claramente el área del lecho quirúrgico del hueso sano que lo rodea, y revelar una estructura ósea normal donde pudieron observarse ambas corticales, y una esponjosa con trabéculas óseas bien desarrolladas.

En el Grupo A (Fig. 2), se comprobó que las partículas de OSTD no fueron reabsorbidas y que estaban rodeadas

por una trama colágena sin células inflamatorias que, a su vez, envolvía la totalidad de la masa implantada. No se encontraron indicios de neoformación ósea. En el Grupo B (Fig. 3), también se observó la presencia de una matriz colágena libre de células inflamatorias, entre las partículas de HA/PTC y alrededor de toda la extensión de la cavidad ósea, incluida la totalidad de la masa del material implantado, y no se encontraron signos de reabsorción. En este mismo grupo, se observó la presencia circunstancial de células gigantes multinucleadas aisladas, que contenían partículas del material en su citoplasma, y algunas de ellas estaban diseminadas dentro de la matriz colágena. Al igual que en el Grupo A, tampoco se observó la neoformación de tejido óseo.

Discusión

La calota de pequeños animales de laboratorio ha venido utilizándose, con diferentes resultados, como modelo experimental para el relleno de cavidades por medio de sustitutos óseos[15,16]. Si bien el espesor del hueso parietal de la rata es relativamente pequeño, el uso de maniobras quirúrgicas bien controladas permite efectuar defectos óseos críticos y ubicar materiales de relleno en las cavidades producidas en la calota, con un alto grado de seguridad[17]. De acuerdo con el modelo experimental utilizado, los sustitutos óseos fueron implantados sin emplear un medio de fijación, lo cual sugiere que la ausencia de formación ósea luego de 60 días podría deberse a que las partículas de ambos materiales sufrieron algún tipo de movimiento dentro de la cavidad que los alojó. Estos resultados coinciden con los de Devegliou *et al*.[17], quienes también observaron tejido fibroso sin desarrollo óseo alrededor del material implantado en calotas de rata. En ese sentido, Esteves *et al.*[15] y Lin *et al.*[18] consideran que la fijación y la estabilidad del material implantado constituyen un factor determinante para que se produzca la incorporación del mismo y la posterior formación ósea. Sin embargo, fue interesante comprobar que los resultados de experiencias previas[15,16,18], en las que se emplearon diferentes materiales sin un medio de fijación, con otros tiempos de observación, fueron similares a los obtenidos en este trabajo.

Debemos considerar que, si bien el escaso número de animales utilizados resulta adecuado para una experiencia piloto[12], el diseño experimental de este trabajo podría ser objetado, ya que los materiales empleados fueron implantados separadamente, en grupos de animales diferentes. Esto se debió fundamentalmente a que en la calota de una rata de 250 g no es posible realizar más de una cavidad crítica del tamaño mínimo necesario. En ese sentido, una serie de investigaciones recientes basadas en el comportamiento de materiales implantados en cavidades críticas en la calota de la rata han utilizado un diseño experimental similar[19-22], con resultados claramente comparables. Debido a que este trabajo fue proyectado como un estudio piloto, y que OSTD y HA/PTC fueron implantados en diferentes grupos de animales con un comportamiento similar, sólo se realizó una descripción de las observaciones. Por otra parte, a pesar de que los animales provenían todos de una misma cría y de que fueron distribuidos al azar en ambos grupos, pudo haber habido variaciones en variables que han sido ignoradas en el presente estudio, y que por esa razón no han sido controladas.

Conclusión

Teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio y las condiciones experimentales adoptadas, los resultados obtenidos a los 60 días posimplantación indican que la hipótesis nula planteada inicialmente deberá ser aceptada, ya que tanto OSTD como HA/PTC son materiales biocompatibles y, además, se observó un comportamiento similar en cavidades críticas efectuadas en la calota de la rata.

Los autores declaran no tener conflictos de interés en relación con este estudio y afirman no haber recibido financiamiento externo para realizarlo.

Referencias

1. Blay A, Tunchel S, Sendyk WR. Viability of autogenous bone grafts obtained by using bone collectors: histological and microbiological study. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:234-40.
2. Adekeye EO. Reconstruction of mandibular defects by autogenous bone grafts: a review of 37 cases. *J Oral Surg* 1978;36:125-8.
3. Beck-Coon RJ, Newton CW, Kafrawy AH. An in vivo study of the use of a nonresorbable ceramic hydroxyapatite as an alloplastic graft material in periapical surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:483-8.
4. Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. *J Biomed Mat Res* 2009;90:171-81.
5. Bagher Z, Rajaei F, Shokrgozar M. Comparative study of bone repair using porous hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate and xenograft scaffold in rabbits with tibia defect. *Iran Biomed J* 2012;16:18-24.

6. Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, *et al*. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, Beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater* 2012;7:15-27.
7. Lavrentiadis I, Molyvdas I, Tzelepi E, Iakovidis D. Clinical and roentgenographic follow-up study of tricalcium phosphate ceramic in bone cavities of apicoectomized teeth. *Hell Period Stomat Gnathopathoprosopike Cheir* 1990;5:9-12.
8. Karabegovic D, Zaklan-Kavic D. Use of synthograft after tooth apicoectomy with extensive bone defect and marginal apical communication to periodontium. *Acta Stomatol Croat* 1990;24:175-83.
9. Barkhordar RA, Meyer JR. Histologic evaluation of a human periapical defect after implantation with tricalcium phosphate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986;61:201-6.
10. Kurkcu M, Benlidayi ME, Cam B, Sertdemir Y. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite versus β-tricalcium phosphate in sinus augmentation. A comparative histomorphometric study. *J Oral Implantol* 2012 (en prensa).
11. Howden GF. Biodegradable ceramics (Synthos) in human endodontic surgery. *J Br Endod Soc* 1977;10:71-6.
12. ISO 10993-1:1992. Biological evaluation of medical devices - Part 1: Guidance on selection of tests. Ginebra 1992.
13. ISO 10993-2:1992. Biological evaluation of medical devices - Part 2: Animal welfare requirements. Ginebra 1992.
14. Bayne K. Developing guidelines of the care and use of animals. *Ann NY Acad Sci* 1998;30:105-10.
15. Esteves JC, Borrasca AG, Aranega AM, García Junior IR, Magro Filho O. Histomorphometric analysis of the repair process of autogenous bone grafts fixed at rat calvaria with cyanoacrylate. *J Appl Oral Sci* 2011;19:529-34.
16. Saska S, Hochuli-Vieira E, Minarelli-Gaspar AM, Gabrielli MF, Capella MV, Gabrielli MA. Fixation of autogenous bore grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009;38:180-6.
17. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J* 2009;28:396-400.
18. Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MD, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone graft: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1990;86:449-56.
19. Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvaria defect. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:372-8.
20. Kim HP, Ji YH, Rhee SC, Dhong ES, Park SH, Yoon ES. Enhancement of bone regeneration using osteogenic-induced adipose-derived stem cells combined with demineralised bone matrix in a rat critically-sized calvaria defect model. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012;7:165-72.
21. Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvaria bone defects. *Tissue Eng Part A* 2012;18:1479-89.
22. Agacayak S, Gulsun B, Ucan MC, Karaoz E, Nergiz Y. Effcets of mesenchymal stem cells in critical-size bone defects. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012;16:679-86.

Contacto:
Osvaldo Zmener
osvaldo@zmener.com.ar
Julián Álvarez 2335 3.º D, C1425DHH
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina