

Una evaluación comprensiva de las características físico químicas de 14 fosfatos de calcio utilizados como materiales de sustitución ósea comparados con hueso natural

D. Tadic. M. Epple*

Biomaterial 25(2004) 987-994

*E-mail: matthias.epple@ruhr-uni-bochum.de

Tel.: +49 2343223151; fax.:+49 234 3214558

Resumen

Catorce diferentes materiales de sustitución ósea de origen sintético o biológico fueron evaluados mediante el uso de rayos X de difracción de alta resolución, espectroscopia con rayos infrarrojos, termo gravimetría y microscopio de barrido electrónico (SEM). Se determinaron los parámetros principales como composición química, cristalinidad y morfología. Los resultados fueron comparados con muestras de hueso natural. Los materiales se pudieron clasificar dentro de diferentes categorías: Hueso tratado con químicos, hueso bovino calcinado, hidroxiapatita derivada de algas, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatitas con carga de péptidos y cerámicas sintéticas de β - TCP.

Introducción

El relleno de los defectos óseos es algo que se realiza a diario en la práctica clínica odontológica. Dentro de los materiales de sustitución ósea, el hueso autógeno sigue siendo considerado hoy en día como el estándar de oro. Este cumple con todos los requisitos físico químicos y biológicos, independientemente de sus inherentes limitaciones (disponibilidad, dolor postoperatorio)(1,5). La alternativa más común al material de injerto autógeno son los injertos alogénicos (humanos) o xenoinjertos (animal, por ejemplo bovino). Los aloinjertos presentan la desventaja de su baja disponibilidad y de la posibilidad de transmisión de infecciones (por ejemplo: VIH, Hepatitis). Con lo xenoinjertos las dudas que surgen son; cual es la respuesta inmunológica del huésped que se ha visto como poco favorable y sí hay posibilidad de transmisión de infecciones.

El hueso autógeno tiene potencial osteogénico (las células del sitio donante tienen la capacidad de sintetizar nuevo hueso en el sitio en el que se realizó el implante), de osteoinducción (se forma nuevo hueso mediante la utilización de células madre vecinas del sitio donante, el cual se diferencia en células formadoras como son los osteoblastos), de osteoconducción (vascularización y formación de nuevo hueso en el sitio del trasplante), y altamente biocompatible (6). Este proceso se facilita mediante la presencia de factores de crecimiento dentro del material del hueso autógeno (especialmente proteínas morfogenéticas)(7). Estas características deben estar presentes en el material de sustitución ósea ideal y todos los materiales de sustitución deben ser descritos a partir de estas características (8).

Las cerámicas sintéticas de fosfato de calcio son altamente biocompatibles y son considerados como alternativas comunes a los injertos autólogos, a los xenoinjertos y a los aloinjertos. Estos productos han ganado gran aceptación para su utilización en diferentes procedimientos dentales y médicos como son rellenos de defectos periodontales, aumentos del reborde alveolar, reconstrucción maxilofacial, implantes de oído, fusiones espinales y recubrimientos de implantes metálicos (10 -15). Los injertos óseos y los injertos sintéticos de fosfatos de calcio (tal como el beta fosfato tricálcico; β -TCP, y la hidroxiapatita; HAP) son usados comúnmente en bloques, cemento, pastas, polvos o gránulos. El propósito de este artículo es describir las propiedades físicas y químicas de estos materiales de injerto comparados con el hueso natural. Como modelo de hueso esponjoso autóloga, se uso muestras de hueso natural, para su evaluación. El funcionamiento biológico de los materiales sintéticos depende de ciertos parámetros fundamentales como son su: composición química, morfología y biodegradación. Un amplio rango de pruebas analíticas se utilizó para investigar estas propiedades (IR, XRD, TG, REM). Como cada uno de estos métodos tiene sus limitaciones, es necesario combinar todos los resultados para obtener una imagen más amplia y comprensiva.

Materiales

Se usaron catorce materiales de sustitución ósea. Los siguientes datos se tomaron de las especificaciones dadas por las compañías manufactureras. Todas las muestras fueron obtenidas de las compañías en viales sellados. Se utilizaron sin realizar ningún tratamiento adicional, excepto cortarlo o fresarlo para adaptarlo al tamaño necesario para su análisis.

El Bioresob®, Chronos®, Ceros®, Cerasorb® y Vitoss® son beta fosfatos tricálcicos (β -TCP) obtenidos mediante un proceso de calcinación a alta temperatura.

Bioresob® esta disponible como granulado poroso (tamaño de partícula: 0,5 – 2 mm) de aplicación casi exclusiva a nivel dental. El Chronos® y Ceros®, son materiales granulados cuyo tamaño de partícula es de 0,5 a 1,4mm y cuyo tamaño de poro es de 100 a 500 μ m (60% del volumen esta dado por los poros), cuya aplicación es principalmente dental. Cerasorb® esta disponible en gránulos porosos (tamaño de poro de 5 μ m) cuyo tamaño de partícula es de 0,05 a 2 mm para aplicación dental y bloques con macroporos para uso en traumatología (ortopedia). Vitoss® es un granulado poroso (tamaño de poro de : 10 – 1000 μ m; porosidad aproximada de 90%; y tamaño de partícula de 3 –5 mm) para aplicación dental.

PepGen P-15® es un hueso bovino calcinado (1100° C; hidroxiapatita) recubierto con un pentadeca péptido (P15, una parte de la secuencia de l colágeno). Esta disponible como un granulado en diferentes tamaños de partículas 0,25- 0,42 μ m y se usa en aplicaciones dentales exclusivamente.

Endobon® y Cerabone® son materiales bovinos sinterizados a alta temperatura (>1200°C), cuyo componente inorgánico es sinterizado a partir de hueso (hidroxiapatita). Estos se administran como bloques de alta porosidad (tamaño del poro de 1mm; porosidad típica del 50%) con dimensiones en el rango de los centímetros. Cerabone® esta disponible en forma de granulado (que no se estudiara acá). Estos materiales se usan en la cirugía ortopédica.

Algipore® es una hidroxiapatita derivada de las algas. Es preparada por una conversión hidrotérmica del carbonato de calcio de las algas en presencia de fosfato de amonio a 700°C. Este proceso preserva la porosidad de las algas. Esta disponible en forma de granulado, cuyo tamaño de partículas es de 0,3 –2 mm y los poros están en el rango de 5 –10 μ m. Su aplicación esta dirigida al área dental.

Ostim® es una hidroxiapatita nanocristalina precipitada, que contiene un 40% de agua. Tiene una consistencia viscosa líquida y puede ser por ello inyectada directamente en el defecto. Nótese la diferencia entre cementos de endurecimiento propio y de este que es un fluido de dispersión. Este puede ser usado tanto a nivel dental como de cirugía ortopédica (traumatología)

BioOss® es el componente inorgánico del hueso bovino (por ejemplo el mineral). Todo el material orgánico es removido mediante un proceso escalonado de esmaltación (hasta una temperatura de 300°C), seguido por un tratamiento químico (NaOH), el cual deja un hueso de hidroxiapatita poroso en forma de pedacitos (bloques o chips). El tamaño de la partícula del granulado es de 0,25 a 2mm. Es usado principalmente en cirugía oral. Hueso de Kiel es un material de injerto óseo que ha sido tratado con químicos como cloroformo y metanol y H₂O₂ para remover todos los componentes orgánicos excepto el colágeno. Actualmente no está disponible para uso clínico. Estuvo disponible como pedacitos de centímetros.

Se obtiene como material de injerto óseo de origen humano o bovino luego de un tratamiento mediante un procedimiento químico escalonado (osmolisis, NaOH, H₂O₂, acetona). Esta disponible como granulado (tamaño de partícula 0,25- 2 mm) y como un bloque o cilindro en centímetros. La interconexión de los poros se encuentra presente en ambas presentaciones (tamaño de poros de varios cientos de μm).

Los datos sobre la precipitación de la síntesis de la hidroxiapatita sintética (comprada de División química de Merck, Darmstadt, Alemania) y del callo óseo humano y del hueso de tumor óseo se tomaron de un estudio previo, realizado sobre la estructura del hueso y de los materiales de sustitución ósea (16).

Métodos

Se realizaron pruebas de rayos X de difracción de alta resolución (XRD), en geometría de transmisión (muestras base de hoja delgada de aluminio de Kapton) a una velocidad de la luz de B2 en HASY-LAB/DESY, Hamburgo, Alemania, con unas longitudes de onda de aproximadamente $\lambda = 2\text{Å}$ (dependiendo de cada experimento individualmente) (16). Para Bioresob®, Chronos®, Ceros®, Vitoss® y PepGen P-15® la difracción se midió en Bruker AXS D8 instrumento Avance de laboratorio (Radiación Cu K α , de 1,54 Å). Espectroscopia con rayos infrarrojos se realizó con el instrumento de Perkin-Elmer 1720 X (Bola de KBr, método de transmisión, 400 – 4000 cm⁻¹, resolución 2cm⁻¹, 10 escaneadas). El análisis de termo gravimetría (TGA) se realizó con un TG/DTA-S II, Instrumento 6000 Seiko Exstar (5 –15 mg; 25-1000°C; 10K min⁻¹; oxígeno dinámico atmosférico; 300ml min⁻¹; AL₂O₃ crucibles). La valoración con el microscopio de barrido electrónico (SEM) se realizó con un instrumento LEO 1530 en muestras rociadas con oro.

Resultados y discusión

La figura #1 muestran la morfología macroscópica de los diferentes materiales Bioresob®, Chronos®, Ceros®, Cerasorb®, Vitoss®, PepGen P-15®, Algipore®, BioOss® y Tutoplast®, disponibles como granulados cuya granulometría típica es de unos cuantos cientos de μm hasta unos pocos milímetros. Ostim® es una pasta fluida con partículas nanoscópicas de apatita en un medio de dispersión acuoso. Cerabone®, Endobon® y Tutoplast® tienen una estructura similar al hueso, con una buena interconexión de poros debido a que todos ellos se derivan de hueso natural y han sido obtenidos a partir de tratamientos térmicos o químicos. En contraste con ellos, los

bloques de Cerasorb® se obtienen mediante un prensado izo estático en frío, seguido de un fresado mecánico de los huecos milimétricos.

Los resultados de los experimentos de rayos X de difracción son indicativos de la composición química (presencia de fase cristalina) como se ve en la figura #2.

Cuatro de las cinco cerámicas del β -TCP muestran diferentes proporciones de impurezas además del predominio de su fase (picos marcados con asterisco en la Fig. 2 a). Todos ellos muestran una alta cristalinidad como indica la cercanía de los picos de la difracción. Bioresob® contiene algo de β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (pirofosfato de calcio; cuyo pico es $30,8^\circ 2\theta$) y α -TCP (cuyo pico es $22,9^\circ 2\theta$). Chronos® y Ceros® contiene un poco de α -TCP y de hidroxiapatita (cuyo pico es $31,6^\circ 2\theta$). Vitoss® contiene β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (cuyos picos están entre $29,0$ y $30,2^\circ 2\theta$). La presencia de fases ajenas a su esencia es muy poco común en todos los casos mencionados anteriormente. Cerabone® y Endobon® son preparados mediante calcinación a alta temperatura de hueso bovino. Como consecuencia de esto, la hidroxiapatita es altamente cristalina (picos de difracción muy estrechos). Endobon® contiene pequeñas cantidades de óxido de calcio (CaO), que resultan de la descomposición del carbonato contenido en el hueso mineral original (apatita de carbonato " $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2 \uparrow$ "; cuyo pico es $37,3^\circ 2\theta$) (17). Huellas de CaO se encontraron en el Cerabone® en la misma posición de 2θ . La fase inorgánica del PepGen® es también una hidroxiapatita altamente cristalina (sin huellas de CaO). Algipore® es una hidroxiapatita con una fase cristalina moderada, sin presencia de fases extrañas.

Ostim® es preparado mediante una rápida precipitación, manteniendo los cristales dentro del rango de los nanómetros. Esto se puede ver mediante los amplios picos de difracción en la figura # 2 c, que corresponde con la hidroxiapatita sintética. No se observan fases extrañas. Curiosamente su cristalinidad es similar a la de BioOss® aun cuando él última proviene de hueso bovino.

Entre más pequeños los cristales mayor difracción de los picos. Todos los materiales similares al hueso caen en esta categoría (Fig. 2d). Todos ellos contienen mineral similar a la hidroxiapatita y ninguno tiene diferencias significativas. La única diferencia significativa la presenta el Tutoplast® (Bovino), que contiene fosfato octacálcico (OCP; $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), como esta indicado por medio del asterisco en la figura 2d (cuyos picos están entre $21,0$ y $24^\circ 2\theta$).

La ampliación del pico de difracción por los cristales pequeños puede ser estimada semi cuantitativamente mediante la ecuación de Scherrer (18)(tabla1):

$$\beta_{1/2} = (K \lambda 57,3) / (D \cos \theta).$$

Aquí $\beta_{1/2}$ es el máximo ancho de pico (como máximo ancho dividido por la mitad) en $^\circ 2\theta$, K es la constante que colocamos en 1 (como se hace frecuentemente), λ es la longitud de onda del rayo X dada en Å, D es el tamaño promedio del dominio (aproximadamente el tamaño del cristal) y θ es el ángulo correspondiente a la difracción del reflejo correspondiente. Esta ecuación da un reflejo estimativo del tamaño del cristal. Cabe anotar que los desordenes estructurales y los fenómenos de tensión por ejemplo causados por la sustitución del carbonato pueden conllevar a picos con defectos más amplios (18). Es por ello que los valores obtenidos solo deben ser usados para la comparación entre estos ejemplos.

Todas las muestras de hueso tienen el mismo tamaño anisotrópico de cristales, por ejemplo aproximadamente 25nm en dirección c [(002) y (004)] y aproximadamente 9nm en dirección a [(210)/(120) y (130)/(310)]. El proceso de Tutoplast® no produce variación en el tamaño de la partícula mineral. BioOss® y Ostim® tienen partículas un poco más grandes (casi el doble en ambas direcciones). En el caso de BioOss® esto se puede deber al calentamiento de la estructura de la fase mineral al llegar a una

temperatura entre 200° C y 400°C (17), durante la preparación del mismo, de acuerdo al reporte de Rogers et al. La hidroxiapatita sintética y el Algipore® presentan partículas casi isotrópicas de aproximadamente tres veces mayores que las partículas del hueso mineral en cada una de las direcciones. Para las muestras altamente cristalinas de Cerabone®, Endobon® y PepGen® el pico de difracción se encuentra en el menor ancho, esto dado por la forma del experimento. Es por esto que solo se puede dar un límite bajo para el tamaño de los cristales (mirar las imágenes de SEM).

Los espectros de infrarrojos se pueden ver en la Fig. #3. Todas las cerámicas de β -TCP son idénticas y solo muestran la banda de fosfato de calcio que es predecible (Fig.3 a). Las cerámicas basadas en hidroxiapatitas en la Fig. 3b muestran solo la banda de fosfato de calcio en una forma aguda y separada. Esto es indicativo de su alta cristalinidad. Algipore® muestra una pequeña banda de carbonato (aprox. 1400cm^{-1}), que puede ser consecuencia de la forma en que se elaboro (de algas de carbonato de calcio). Aún cuando el PepGen® contiene pépticos bioactivos, no se observan bandas de material orgánico (como se ve abajo). Esto es debido a la ínfima cantidad que se encuentra presente. En la Fig. 3c, se ven las cerámicas de nanocristales de hidroxiapatita. Las bandas de fosfatos son generalmente más amplias debido al pequeño tamaño de la partícula de cristal. Adicionalmente hay bandas de agua. En Ostim® es el único en el que no se ve bandas de carbonatos. Esto muestra que la hidroxiapatita al igual que el BioOss® tienen incorporadas pequeñas cantidades de partículas de carbonatos. Las muestras de hueso que se ven en la Fig. 3d, todas contienen colágeno y tejido orgánico en diferentes proporciones. Adicionalmente a las bandas de fosfato de calcio, podemos ver una multitud de bandas que están relacionadas con el material orgánico y la incorporación del agua.

Todas las muestras fueron sometidas al análisis de termo gravimetría (TG), para determinar el contenido de agua, el material orgánico (como colágeno), y el material mineral (fosfato de calcio). Una curva típica es la que vemos en la Fig.4 (Tutoplast® humano). Como se derivó de experimentos anteriores con análisis de espectrometría masiva para valorar la liberación de gases, tres rangos de masa se pueden asignar a procesos específicos (16). Desde la temperatura ambiente hasta unos 200°, el agua que se ha incorporado, se pierde. Arriba de los 300°C, se ve que los materiales orgánicos como el colágeno, el tejido graso y las proteínas comienzan a quemarse. A 400°C solo se ve que la fase mineral (fosfatos de calcio) queda intacta. Sí la fase mineral contiene algo de carbonatos en forma de carbonato de apatita, se ve una pérdida de masa entre 400°C y 900°C (16,20). Por eso es posible determinar el contenido mineral de estos experimentos de TG. Recuerde que todas las apatitas son apatitas carbonadas (15). La tabla 2 muestra toda la composición de los datos obtenidos en el análisis de los experimentos TG (promedio de dos experimentos). Todas las fases de β -TCP excepto la de Vitoss® no muestran pérdida de masa, lo que indica que hay ausencia de material volátil o combustible. En el caso de Vitoss®, una pequeña pérdida de se registro al llegar a una temperatura entre 200°C y 400°C. Esto puede deberse a un material orgánico de unión que se usa para la granulación. Todas las muestras de hidroxiapatitas calcinadas (Cerabone®, Endobon® y PepGen®) no muestran pérdida de masa, como era de esperarse, debido a la preparación de estos materiales a altas temperaturas para su calcinación. La cantidad de pépticos en el PepGen® es tan bajo que no es detectable la pérdida de masa. Algipore® contiene pequeñas cantidades de agua, pequeña cantidad de material orgánico y algunos carbonados como se supone por su pérdida de peso a altas temperaturas (Descomposición de hidroxiapatita carbonada en hidroxiapatita y óxido de calcio). Ostim® contiene aproximadamente un 40 de agua y lo que sobra es una hidroxiapatita libre de carbonatos. Los materiales que contienen la totalidad o la

mayoría de la matriz orgánica del hueso (Hueso de Kiel, Hueso natural y Tutoplast®) tienen una composición similar, con contenido en agua (6 al 8 % del peso), algo de material orgánico (20 al 50 % del peso) y la fase mineral de carbonato de hidroxiapatita. Es interesante ver que el contenido de carbonato en los materiales similares al hueso (Hueso de Kiel, BioOss® y Tutoplast®) es altamente variable. Si computamos una proporción del rango del peso de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ a CaCO_3 en estas muestras, vemos que obtenemos valores entre 6 y 30. Como el rango en las muestras de hueso natural también es tan variable (vemos rangos entre 13 y 37 en estas muestras de hueso), podemos concluir que la similitud con el mineral óseo está presente, incluso después de haber pasado por tratamientos químicos y térmicos moderados.

La Fig.5 muestra las imágenes representativas de SEM, que ilustran la típica imagen de la morfología de estos materiales. En la Fig.5 a, Cerasorb® muestra su apariencia granular de un material de sinterización con una gran visibilidad de los microporos en una alta magnificación. En la Fig. 5b, el hueso calcinado bovino (Cerabone®) tiene la estructura porosa muy bien interconectada, como lo es el hueso original. A una mayor magnificación se ven los cristales primarios de la hidroxiapatita sinterizada. El tamaño de las partículas es micrométrica. En la Fig. 5c, se puede ver la estructura química recubierta de alga del Algipore®. La graduación de la porosidad (similares al hueso cortical y lamelar, pero en una dimensión más pequeña), se debe a los requerimientos biológicos de las algas. A una mayor magnificación, nosotros podemos ver las partículas primarias de un micrómetro o menos. En la Fig. 5d el material óseo bovino tratado con químicos de Tutoplast® podemos ver. Como en la Fig. 5b, podemos ver la interconexión de los macroporos del hueso. Sin embargo como este material no se le ha realizado la sinterización, este contiene todavía la matriz de colágeno. A una mayor magnificación, nosotros no podemos ver la sinterización de la hidroxiapatita, pero sí podemos ver la estructura fibrosa del hueso original.

La tabla 3 es el resumen de toda la información sobre la estructura y morfología. Se puede ver que estos materiales difieren en su composición. También es claro que el uso de la definición de “cerámicas de fosfato de calcio” no es suficiente para referirse a estos materiales. Con respecto a la biodegradabilidad es posible hacer algunas predicciones, basados en la literatura disponible. Las cerámicas de β -TCP se degradan más rápidamente que las cerámicas de Hidroxiapatita (21-23). Adicionalmente hay diferencia entre las cerámicas de hidroxiapatita sinterizadas y las hidroxiapatitas precipitadas. La primera muestra una degradación muy lenta (si es que ocurre alguna). Si el tamaño de los cristales de las cerámicas de hidroxiapatita es muy pequeña (como en el hueso), y/o si hay carbonato incorporado a ellos, la degradación se ve altamente incrementada por su alta solubilidad (22-26). Esto se aplica a los injertos óseos que contienen la matriz de colágeno. En este caso, se observa una biodegradación y un potencial biológico de la matriz ósea incorporada (7,27).

Conclusiones

Se investigaron 14 materiales de injerto óseo. Los resultados obtenidos al comparar la hidroxiapatita sintética con muestras de hueso natural (como se refiere al hueso autólogo). Su morfología y composición son fuertemente diferentes, por lo tanto el material cubre un amplio rango de aplicaciones, que van desde los implantes permanentes a implantes rápidamente degradables con potencial osteogénico.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por los fondos de las industrias químicas (Frankfurt am Main, Alemania)

Bibliografía