

Trabajos Originales:

SULFATO DE CALCIO EN REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA

Estudio comparativo de su uso solo o enriquecido con minerales

Recibido para arbitraje 14/09/2009

Aceptado para publicación: 06/10/2010

- **López Mariano Ariel**

Dirección: Diagonal 113 Nro. 476 Dto. 8 entre 117 y 118, Ciudad de La Plata, Prov. Bs. As, República Argentina. Código postal 1900.

Último grado académico: Magíster en Implantología Oral. Ayudante Ordinario Diplomado de Primera de la Asignatura de Prótesis "A", Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata y Becario (Perfeccionamiento) de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina).

Socio Adherente de la S.A.I.O (Sociedad Argentina en Investigación Odontológica) y Socio Activo de la I.A.D.R (International Association for Dental Research)

- **Ayala Miguel**

Dirección: Calle 60 entre 117 y 118, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Prov. Bs. As, República Argentina. Código postal 1900.

Último grado académico: Médico Veterinario. Jefe de Trabajos Prácticos Ordinario de la Asignatura de Animales de Laboratorio, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina).

Investigador categoría IV. Programa de incentivos, Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología de la Nación Argentina.

Presidente de la ACCyTAL (Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio)

- **Cecilia Carbone**

Dirección: Calle 60 entre 117 y 118, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Prov. Bs. As, República Argentina. Código postal 1900.

Último grado académico: Médica Veterinaria. Profesora Titular Ordinaria de la Asignatura de Animales de Laboratorio, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina).

Investigadora categoría II. Programa de incentivos, Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología de la Nación Argentina.

Secretaria General de ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science).

Reconocimientos:

Dr. Enrique Portiansky (Servicio de Microscopía de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina). Colaborador durante el procesado y evaluación de las histologías.

Od. Adolfo Báez (Ayudante Diplomado Ordinario de Primera de la Asignatura de Prótesis "A", Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina). Colaborador como ayudante en las cirugías.

RESUMEN

Los biomateriales para regeneración ósea son cada vez más utilizados. Los de origen sintético son a menudo mejor aceptados por los pacientes. Entre ellos, el sulfato de calcio ha sido ampliamente usado. La continua aparición de nuevos productos indica que el material ideal aun esta por descubrirse. **Objetivos:** Desarrollar y evaluar un biomaterial a base de sulfato de calcio sólo y enriquecido con minerales. **Material y Métodos:** Se utilizó sulfato de calcio de grado médico y minerales óseos los cuales fueron injertados en forma de partículas en defectos óseos del fémur de 20 ratas Wistar. Al Grupo 1 se le injertó Sulfato de Calcio, al Grupo 2 Sulfato de Calcio enriquecido con minerales, y el Grupo 3 (control). Se tomaron muestras a los 30 días las cuales fueron preparadas para microscopía. Las mismas fueron digitalizadas y se evaluó la superficie de hueso regenerado, dentro del defecto. **Resultados:** La superficie regenerada, en mm² para el grupo 1 fue de 9,878 (0,833), para el grupo 2 de 11,317 (0,937) y para el grupo 3 de 4,370 (0,549). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P = <0,001$) -ANOVA (análisis de varianza). En las comparaciones apareadas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($P = <0,005$) Holm-Sidak. **Conclusiones:** El material desarrollado es bien tolerado y posibilita la regeneración completa de un defecto crítico cuando fue tratado con Sulfato de Calcio enriquecido con minerales. Pruebas clínicas son necesarias para una mejor comprensión de su posible utilización como sustituto óseo.

Palabras clave: Injertos de hueso - Regeneración Ósea - Sustitutos sintéticos

SUMMARY

Biomaterials for bone regeneration are increasingly used. Those of synthetic origin are often better accepted by patients. Among them, calcium sulfate has been widely used. The continuing emergence of new products indicates that the ideal material has yet to be discovered. **Objectives:** To develop and evaluate a biomaterial based on calcium sulfate alone and enriched with minerals. **Material and Methods:** We used calcium sulfate and medical grade mineral bone which were grafted in the form of particles in the femur bone defects of 20 Wistar rats. Group 1 was grafted calcium sulfate, the Group 2 enriched with calcium sulfate minerals, and Group 3 (control). Samples were taken for 30 days which were prepared for microscopy. These were digitized and evaluated the surface of regenerated bone within the defect. **Results:** The reclaimed area in mm² in group 1 was 9.878 (0.833), for group 2 11.317 (0.937) and group 3, 4.370 (0.549). Statistically significant differences were observed between groups ($P = <0.001$)-ANOVA (analysis of variance). In paired comparisons were statistically significant differences between all groups ($P = <0.005$) Holm-Sidak. **Conclusions:** The developed material is well tolerated and allows the complete regeneration of a critical defect when he was treated with calcium sulfate enriched with minerals. Clinical trials are needed to better understand their potential use as bone substitute.

INTRODUCCIÓN

Regenerar el hueso perdido ha sido desde tiempo atrás objeto de muchos estudios. En el campo de la odontología, a partir del desarrollo de la implantología es que comenzaron a realizarse cada vez más estudios con respecto a este tema, debido a la falta, en muchas ocasiones, de hueso disponible para colocar implantes.

Por esto, en los últimos tiempos, las investigaciones han estado centradas en crear nuevo hueso donde sea necesario, y así poder aumentar el número de personas que puedan recibir implantes.¹⁻²

Con este fin se han utilizado diversos materiales y técnicas. Dentro de ellos están las membranas, que actúan como una barrera para mantener el volumen de los defectos del hueso, aislándolo a su vez del tejido conjuntivo.³

No obstante, cuando el defecto óseo a tratar es muy grande, o bien no es favorable, es necesario realizar injertos de hueso para ganar el volumen perdido. El uso de hueso del mismo paciente ha sido probado, y es elegido como primera opción para estos procedimientos, aunque conlleva una cirugía adicional para tomar el hueso a injertar, usualmente de la zona del mentón, trígono retromolar, tuberosidad del maxilar o, menos frecuentemente, de calota craneana o cresta ilíaca, dependiendo de la cantidad necesaria.⁴ Muchas veces para los pacientes esta cirugía adicional es muy traumática. Para evitar este problema, se han propuesto aloinjertos (hueso humano procesado en diferentes formas), xenoinjertos (por ej. hueso bovino), o material aloplásticos a base fosfato de calcio y sulfato de calcio.^{4 a 11}

En trabajos previos de nuestro grupo se evaluó un sustituto óseo sintético a base de Sulfato de Calcio, con resultados preliminares alentadores, aunque con una velocidad de reabsorción relativamente lenta.⁴ Esto último podría solucionarse generando partículas de menor tamaño y mayor porosidad.

Por otra parte, el hueso presenta una gran cantidad de minerales, que podrían combinarse dentro de un sustituto sintético para mejorar la mineralización del hueso neoformado, aunque esto no ha sido evaluado aún.

El objetivo de este estudio fue desarrollar y evaluar un biomaterial para regeneración ósea a base de Sulfato de Calcio enriquecidos con minerales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 30 ratas macho, de cepa Fisher 344 (F344/N), originarias del Instituto Nacional de Salud de los EE.UU., y producidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, endocriadas, libres de patógenos específicos (SPF), de 16 semanas de edad y de 500 gramos de peso.

Los animales fueron divididos en tres grupos de 10 cada uno. (Figura 1)



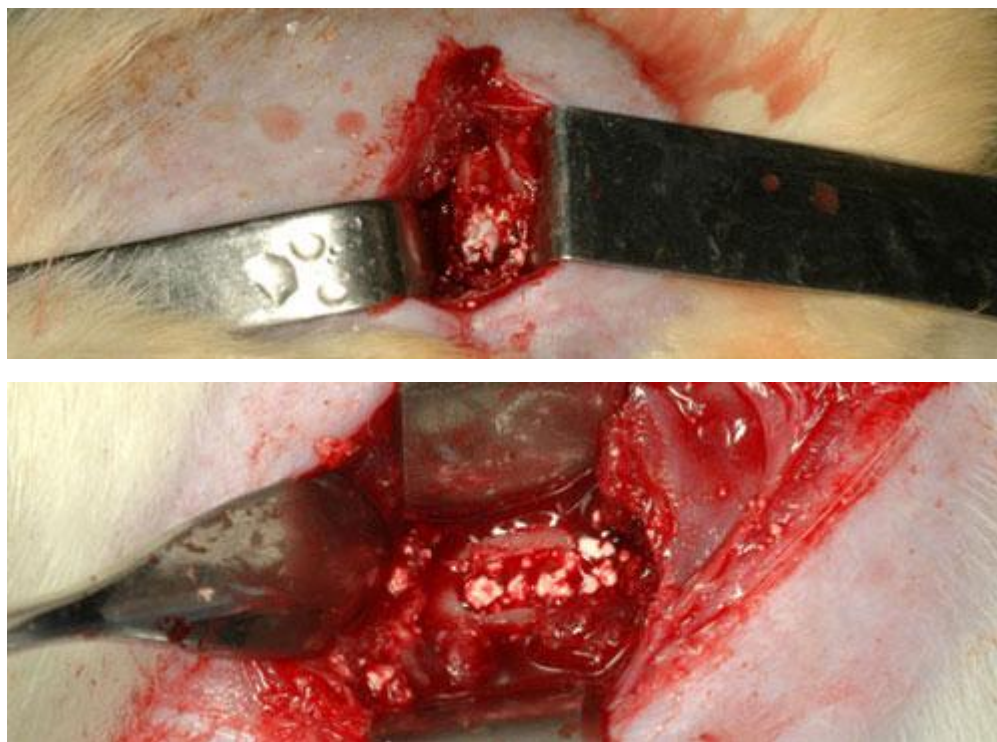
Todas fueron operadas bajo anestesia general con ketamina/xilacina 60 mg/kg + 10 mg/kg por vía IM. Se utilizó un motor de cirugía eléctrica con irrigación de solución fisiológica incorporada (Steri-Oss), pieza de mano recta, fresa redonda de 3 mm de diámetro e instrumental quirúrgico para el acceso al hueso.

Se depiló la piel en la zona del fémur, luego se realizó una incisión en piel con bisturí y se continuó en el plano muscular con tijeras por divulsión, hasta identificar el hueso. (Figura 2 y 3)

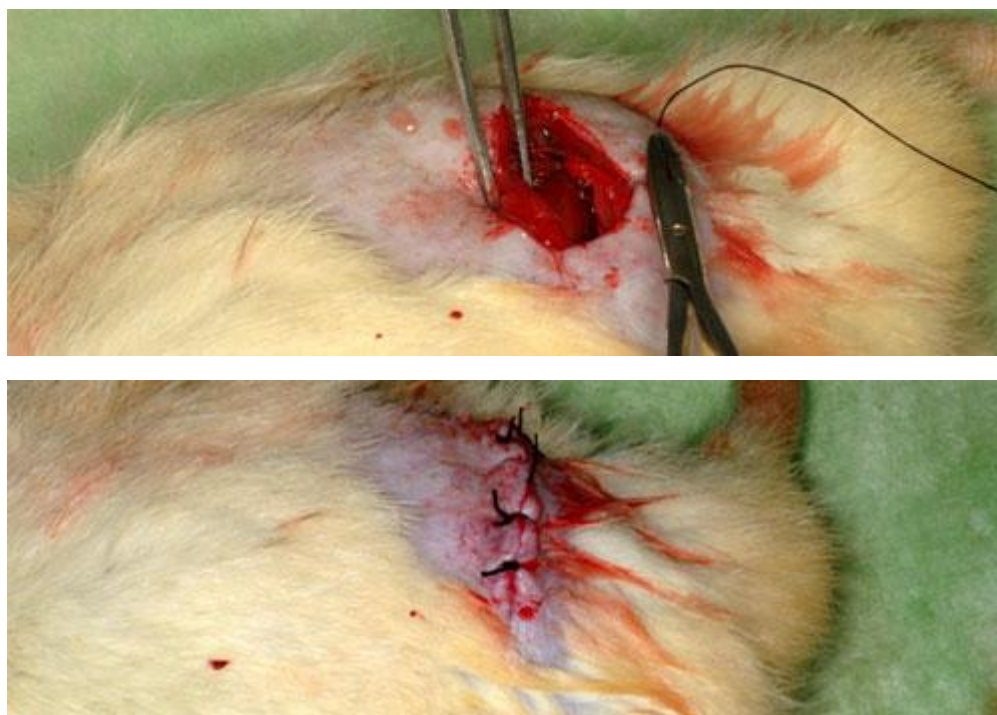


Una vez limpio y retirado el periostio, se realizó una perforación de 9 mm de largo, por 3 mm de ancho y 3 mm de profundidad. Al grupo 1 se le injertó Sulfato de Calcio, al grupo 2 Sulfato de Calcio enriquecido con minerales y el grupo 3 no recibió tratamiento quedando como grupo control. (Figura 4, 5 y 6)





Una vez finalizado, se realizó una sutura por planos. (Figura 7 y 8)



El Sulfato de Calcio en partículas se realizó mediante el fraguado del mismo en polvo al combinarlo con solución fisiológica estéril, y se generó posteriormente las partículas por fragmentación. El enriquecimiento con minerales se efectuó combinando un 50% de polvo de Sulfato de Calcio y un 50% de minerales en polvo y luego produciendo el fraguado como en el caso anterior. El polvo de minerales está compuesto por un 50% de calcio; 35% de fósforo; 10% de carbonato; 1,5 % de magnesio; 1,5% de flúor; 1% de potasio; y 1% de sodio.

Durante el postoperatorio, los animales permanecieron alojados bajo observación en el pabellón de animales de experimentación de la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

A los 30 días los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono, y los fémures resecados mediante cortes con tijera sobre los ligamentos de las articulaciones. Luego las muestras fueron fijadas en formol al 10% a 40C, descalcificadas en EDTA, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo, montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina - eosina, para su posterior observación a través de un microscopio óptico. (Figura 9)



Los preparados fueron capturados mediante una cámara de video (Sony DXC-151A) montada sobre un microscopio óptico (Olympus SZ 40) y posteriormente digitalizados mediante una placa digitalizadora (Flashpoint 128, Integral Technologies, USA).

Por último se recolectaron las muestras y fueron evaluadas con un analizador digital de imágenes (ImagePro Plus v4.1. - Media Cybernetics, USA) para calcular el grado de regeneración obtenido. Los distintos elementos de la imagen histológica fueron segmentados en base al color de la tinción, y posteriormente calculada su superficie.

Estos estudios se llevaron a cabo en el Servicio de Microscopía de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, República Argentina.

RESULTADOS

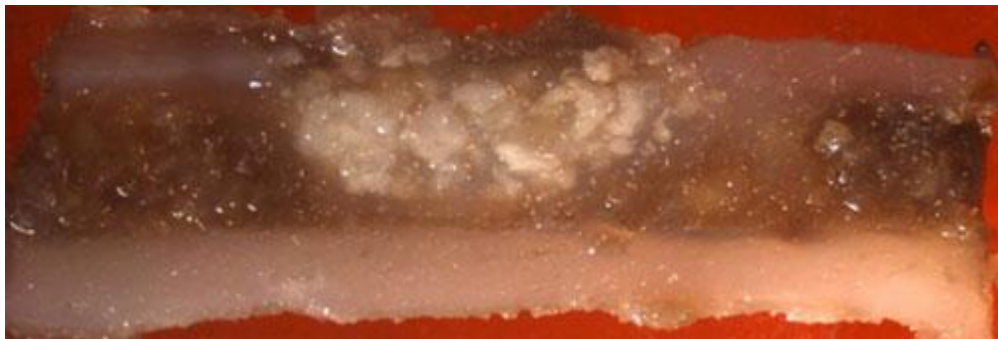
El material logrado de Sulfato de Calcio solo y enriquecido con minerales presentó una consistencia blanda, fácil de manipular, buena porosidad con gran capacidad de embeberse en sangre y mostró buena tolerancia.

La producción de ambos materiales es relativamente sencilla y económica.

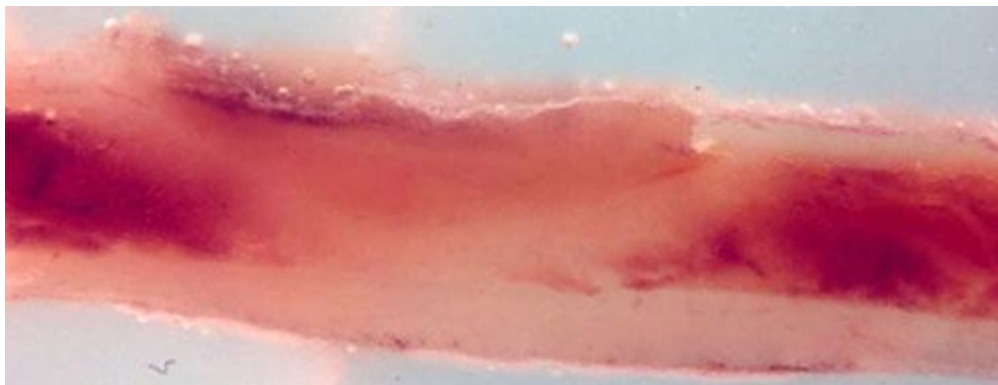
Se observó que en el caso del enriquecido con minerales, la estructura resultó en una aparente mayor porosidad, con respecto al Sulfato de Calcio solo. Asimismo, la incorporación de dichos minerales aceleró la reacción de fraguado del material, probablemente por el contenido de sales de los minerales, que como

ya sabemos las sales acelera el tiempo de fraguado de los sulfatos.

Macrocópicamente en el grupo 2, se pudo determinar la formación completa del defecto óseo, notándose la presencia de partículas del injerto en el mismo (Figura 10).

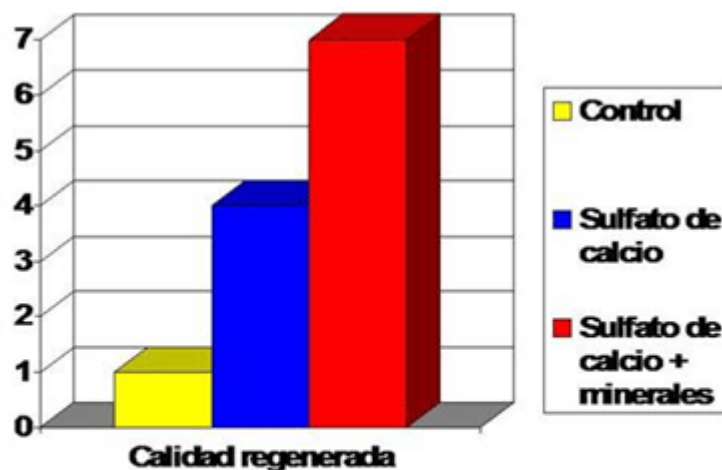


En el grupo 1, se observó una formación incompleta, en grados variables, y escasos restos del injerto, aparentemente por una reabsorción muy veloz. (Figura 11).



En el grupo 3, no se produjo regeneración, quedando una amplia cavidad residual. De acuerdo a las diferentes formaciones de hueso la arquitectura se consideró:

1. Buena (Regeneración completa con patrón trabecular bien definido), en el grupo 2 correspondiente al Sulfato de Calcio enriquecido con minerales.
2. Aceptable (Regeneración completa con patrón trabecular más irregular), en el grupo 1 correspondiente al Sulfato de Calcio solo.
3. Mala (Regeneración incompleta) en el grupo 3 correspondiente al grupo Control. (Figura 12)

CALIDAD DE LA REGENERACIÓN OBTENIDA

Referencias: 1. Mala
4. Aceptable
7. Buena

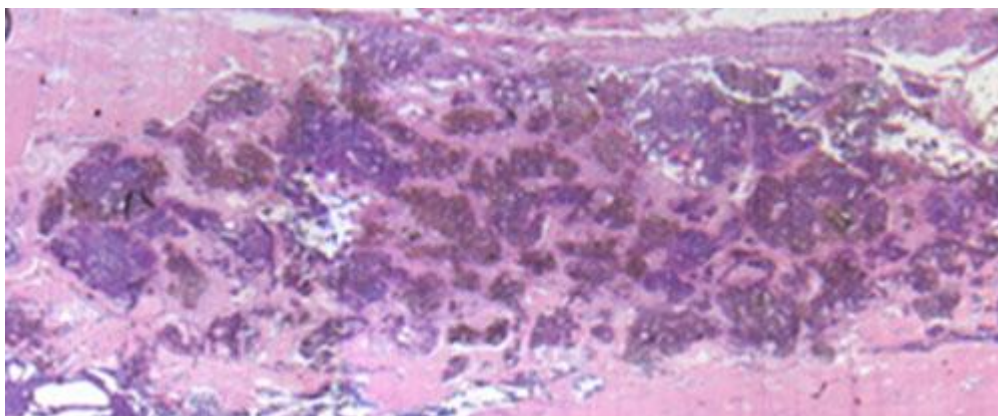
Obs: Los números son arbitrarios, y fueron seleccionados con el único fin de mostrar las diferencias

Microscópicamente, en ambos grupos experimentales, no se observaron reacciones inflamatorias importantes, ni signos de encapsulamiento fibroso del material, lo cual lo sitúa como biocompatible.

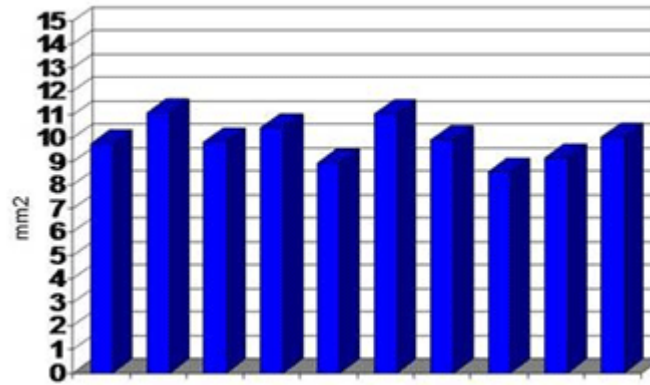
Asimismo, en el grupo 2, histológicamente se observa la regeneración completa de los defectos, con formación de trabéculas de grosores variables e interconectividad entre las mismas. La superficie regenerada, en mm² para el grupo 1 fue de 9,878 (0,833) (Figura 13 y 14), para el grupo 2 de 11,317 (0,937) (Figura 15 y 16) y para el grupo 3 de 4,370 (0,549) (Figura 17 y 18).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P = <0,001$) -ANOVA (análisis de varianza).

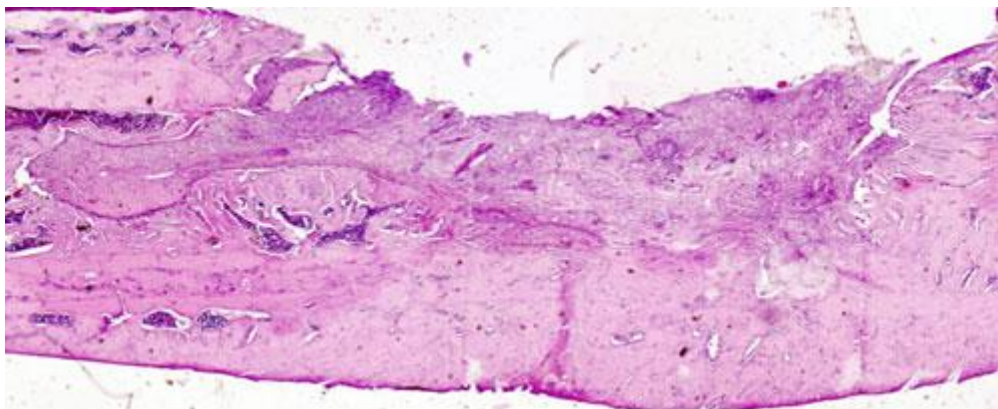
En las comparaciones apareadas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($P = <0,005$) Holm-Sidak.



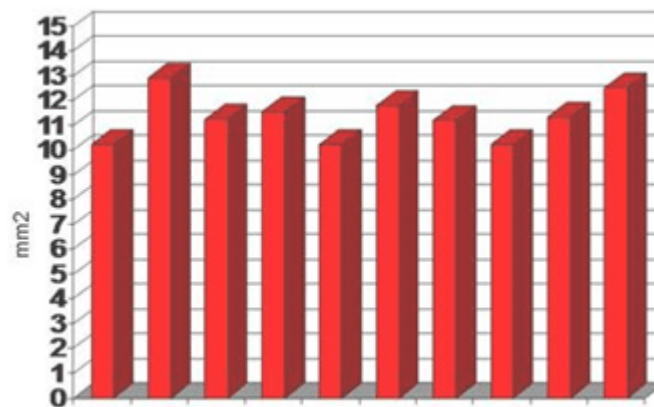
Sulfato de Calcio, Superficie regenerada



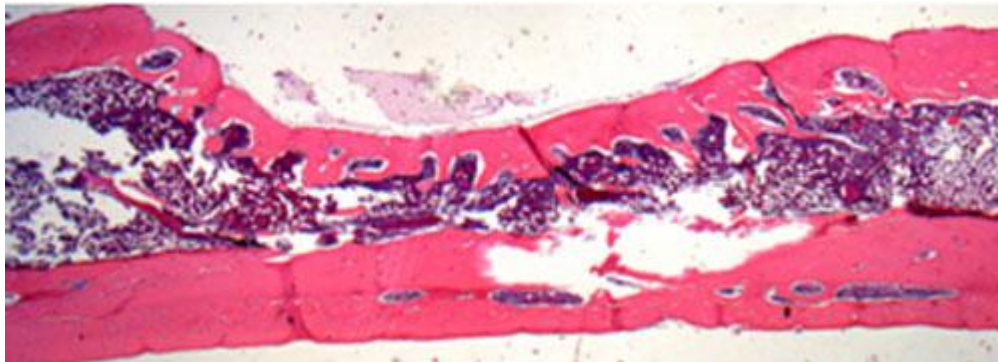
Obs: Cada barra representa un animal (Figura 13 y 14),



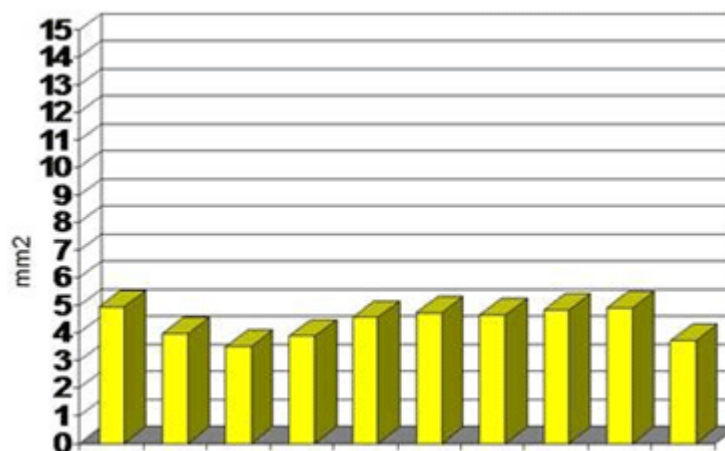
Sulfato de Calcio + Minerales, Superficie regenerada



Obs: Cada barra representa un animal (Figura 15 y 16)



Control. Superficie regenerada



Obs: Cada barra representa un animal
(Figura 17 y 18)

DISCUSIÓN

El sulfato de calcio tiene una larga, y controvertida, historia de uso en medicina y odontología. Muchas investigaciones, han demostrado que el Sulfato de Calcio es un material biocompatible y que es reabsorbido totalmente después de la implantación pero no crea un entorno rico de calcio, aunque se pudo demostrar que estos iones de calcio pueden proporcionar un cierto estímulo a los osteoblastos. Asimismo estudios histológicos e histométricos en tibias de la rata, demostraron que el uso de Sulfato de calcio como barrera en defectos quirúrgicos injertados con cristales bioactivos tenían considerablemente más formación de hueso que el grupo que utilizó el cristal bioactivo solamente, 30 días después de las cirugías, afirmando así que el Sulfato de Calcio se puede utilizar como osteoconductor en la regeneración ósea.

En el campo de la medicina, especialmente en cirugía general, el uso de este material de injerto como relleno de cavidades óseas post-quirúrgicas, Ej.: quistes, tumores, etc., han sido de primera elección debido a su gran rigidez después del fraguado y de su larga permanencia debido a su lenta reabsorción, disminuyendo así grandes pérdidas óseas y fracturas patológicas.

En el campo de la odontología, en especial con la aparición de los implantes, el uso del Sulfato de Calcio generó inconvenientes debido a su lenta reabsorción, ya que generalmente el hueso regenerado es

utilizado como sostén y mantenimiento de los implantes. Esto trae como inconveniente la postergación de las cirugías en la colocación de implantes mediatos. Es por esto que se comenzó a utilizarlo en forma de partículas de menor tamaño y mayor porosidad, para acelerar su reabsorción y reemplazo por hueso cicatrizal.

Otros estudios del sulfato de calcio fue en cirugías periodontales para el tratamiento de la clase III de furcación donde se evaluó la eficacia de éste combinado con hueso liofolizado desmineralizado.

Esta combinación con una barrera de sulfato de calcio reabsorbible tuvieron significativamente más de inserción clínica que el grupo control (sin injerto), donde hubo recesión gingival. Además el grupo experimental mostró significativamente mayor llenado y volumen del defecto.

En nuestro trabajo mediante la incorporación de minerales óseos al Sulfato de Calcio, se mejoraron las propiedades del hueso cicatrizal haciéndolo mas denso y acelerando la remineralización ósea por la sola presencia del mineral.

Todo material de sustitución ósea tiene un objetivo fundamental, que es actuar como matriz para el crecimiento del hueso, y luego de esto ser reabsorbido hasta ser reemplazado totalmente por tejido óseo vivo. Una matriz ideal debería ser lo más porosa posible, para favorecer la revascularización, pero a la vez no tanto para que no se reabsorba antes de cumplir su cometido. En este sentido, nuestras apreciaciones iniciales muestran como el sulfato de calcio solo se ha reabsorbido antes del tiempo necesario. Mientras tanto, en el combinado con minerales la reabsorción fue más lenta, siendo interesante destacar, como mencionamos al principio, que esta combinación poseía una mayor porosidad, al menos hasta el nivel de detalle evaluado al momento.

Por último, cabe agregar que la materia prima de la cual se hace el sulfato de calcio es relativamente barata y abundante. En este caso disponemos de un nuevo biomaterial, mucho más económico que los disponibles actualmente, aunque aun restaría hacer pruebas clínicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Intini G, Andreana S, Intini FE, Buhite RJ, Bobek LA. "Calcium sulfate and platelet-rich plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration". *J Transl Med.* 2007 Mar 7; 5:13.
2. Hak DJ. "The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma". *J Am Acad Orthop Surg.* 2007 Sep; 15(9):525-36.
3. De Macedo NL, De Macedo LG, Monteiro Ado S. "Calcium sulfate and PTFE nonporous barrier for regeneration of experimental bone defects." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Jun 1; 13(6):E375-9.
4. Luchetti, C. "Injertos Autólogos, Alógenos, Xenógenos y Sintéticos en el Tratamiento de Grandes Defectos Estructurales del Hueso". *Revista Argentina de Osteología,* 2005, 4 (1): 9 - 23
5. Podaropoulos L, Veis AA, Papadimitriou S, Alexandridis C, Kalyvas D. "Bone regeneration using beta-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix." *J Oral Implantol.* 2009; 35(1):28-36.
6. Thomas MV, Puleo DA. "Calcium sulfate: Properties and clinical applications." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Feb; 88(2):597-610.
7. Lazáry A, Balla B, Kósa J, Bácsi K, Nagy Z, Takács I, Varga PP, Speer G, Lakatos P. "Review of the application of synthetic bone grafts. The role of the gypsum in bone substitution: molecular

biological approach, based on own research results". *Orv Hetil.* 2007 Dec 23; 148(51):2427-33.

8. Guarnieri R; Aldini NN; Pecora G; Fini M; Giardino R. "Medial-grade calcium sulfate hemihydrate (surgiplaster) in healing of a human extraction socket-histologic observation at 3 months:a case report". *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005 Jul-Aug;20(4):636-41
9. Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messori MR. "Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria." *Clin Oral Implants Res.* 2007 Jun; 18(3):311-8. Epub 2007 Feb 13.
10. Intini G, Andreana S, Intini FE, Buhite RJ, Bobek LA. "Calcium sulfate and platelet-rich plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration." *J Transl Med.* 2007 Mar 7; 5:13.
11. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Kassolis JD, Prasad HS, Rohrer MD. "Calcium sulfate-carboxymethylcellulose bone graft binder: Histologic and morphometric evaluation in a critical size defect." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 Nov; 83(2):451-8.