

Osteorregeneración: coagulite vs hidroxiapatita vs coagulite-hidroxiapatita en lesiones en maxilares de rata, con tomografía axial-computarizada y microscopía electrónica de barrido

M.C. Marcela Alejandra Aguilar-Cuevas,* Dr. Roberto Vega-Zapata,** Dr. Carlos E. Abrego-Ayala,*** Dr. Juan Manuel Junco-Carrera**** Dra. Silvia Antuna-Bizarro,***** Dr. Jesús Torán-Sierra***** Dra. Bárbara Novelo Garza,*****
Dra. Margarita V. García-Garduño*****

Facultad de Odontología, UNAM, Ciudad de México

RESUMEN. El propósito de este estudio fue evaluar la osteorregeneración de lesiones provocadas en maxilares de ratas Wistar, acelerando el proceso por medio de biomateriales simples y combinados. Se implantó coagulite o hidroxiapatita o coagulite-hidroxiapatita en seis ratas Wistar sanas, machos, de 24 semanas de edad y se siguieron los siguientes procedimientos según las normas de bioética en animales de experimentación: se anestesiaron con zolazepam y tiletamina (0.4 ml), abordaje quirúrgico con la técnica Semi-Newman; se les realizaron cuatro perforaciones en la maxila: dos del lado derecho y dos del izquierdo, con fresa redonda de carburo de 2 mm de diámetro. Posteriormente se implantaron los biomateriales en cada una de las perforaciones. A (coagulite) maxilar derecho en la unión cigomática-maxilar; B (hidroxiapatita), entre el primer y segundo molares derechos, C (coagulite-hidroxiapatita) en la unión cigomática-maxilar izquierda y D (control) entre el primer y segundo molares izquierdos. Estas lesiones fueron analizadas por tomografía axial computarizada, microscopía electrónica de barrido y análisis histológico. Para los valores densitométricos obtenidos a las 3, 6, 9 y 12 semanas de implantados los biomateriales, el análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencia estadística significativa con una $p < 0.018$. En el análisis de superficie (lleno de las cavidades), a 3, 6, 9, 12 y 15 semanas se utilizó la prueba de Kruskal Wallis, ésta mostró una diferencia estadística significativa con una $p < 0.03$. El análisis histológico mostró

SUMMARY. The purpose of this study was the evaluation of bone regeneration in laboratory produced injuries in the maxilla of Wistar rats, accelerating the process by simple or combined biomaterials. Coagulite or hydroxyapatite or coagulite-hydroxyapatite was placed in six Wistar male rats, aged 24 weeks and the following procedures were made according to bioethics rules in experimentation animals: Rats were treated under anesthesia by zolazepam and tiletamin (0.4 ml). Surgical approach by the Semi-Newman techniques was performed by four holes in maxilla: two on the right side and two on the left side with 2 mm carbide rounded drill biomaterials were placed in each cavity asfollows: A (coagulite) in zygomaticomaxillary joint of right side; B (hydroxyapatite) between 1st and 2d right molars, C (coagulite-hydroxyapatite) in the left zygomaticomaxillary joint and D (Control) between left 1st and 2nd molars. These lesions were analized by computed axial tomography (CAT) electron microscope scanner and histological analysis. The densitometric values obtained at 3, 6, 9 and 12 weeks were submitted to a variant analysis (ANOVA) and demonstrated a significant statistical difference (< 0.01). In the surface analysis (filling of cavities) at 3, 6, 9, 12 and 15 weeks, the Kruskal Wallis test was used with significant statistical difference ($p < 0.03$). Hystologic analysis, demonstrated coagulite had the best morphodifferentiation process in the micro-structure for tissues engineering. In conclusion CAT is a good alternative for assessment

* Alumna de Doctorado. Laboratorio de Biomateriales, División de Estudios de Postgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM, México, DF.

** Jefe de Enseñanza. Hospital de Urgencias Traumatológicas "Dr. José Manuel Ortega Domínguez", IMSS, México, DF.

*** Subdirector Médico. Hospital de Urgencias Traumatológicas "Dr. José Manuel Ortega Domínguez", IMSS, México, DF.

**** Director General del Instituto de Investigación Científica, AC. México, DF.

***** Técnico Académico Asociado "C" tiempo completo. Profesor de Asignatura "A", Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, México, DF.

***** Jefe de Imagenología del Hospital General Regional No. 1 "Gabriel Mancera", IMSS, México, DF.

***** Directora del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS, México, DF.

***** Investigador Nacional Nivel I, Profesor de Carrera Titular "A" tiempo completo, Profesor de Asignatura "B" definitivo de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, de la Facultad de Medicina y de la Facultad de Ciencias, Estancia de Investigación Instituto de Física, UNAM, México, DF.

Dirección para correspondencia:

M.C. Marcela Alejandra Aguilar-Cuevas. Manzana 4, grupo 43, Casa No. 1, Unidad Habitacional Santa Fe. Delegación Alvaro Obregón, Código Postal 01170, México, Distrito Federal. Teléfonos: 55 16 15 57 y 52 76 31 06 Correo electrónico: Dentalma@prodigy.net.mx

que el coagulite tiene el mejor proceso de morfodiferenciación de las microestructuras en la ingeniería tisular. Se concluye que la tomografía axial computarizada es una alternativa para evaluar osteorregeneración *in vivo* y que el coagulite es más eficaz en osteorregeneración que la hidroxiapatita y que el coagulite-hidroxiapatita de lesiones maxilares en ratas Wistar.

Palabras clave: osteorregeneración, adhesivos celulares, hidroxiapatita, maxilares de ratas Wistar, tomografía axial-computarizada, microscopía electrónica de barrido y análisis histológico.

El curso actual en investigación de biomateriales para osteorregeneración se dirige a la producción de compuestos que presenten las propiedades del hueso autólogo, sobre matrices osteoconductoras que eliminan los traumas, molestias y riesgos causados por una cirugía complicada y sobre todo, el prescindir del autoinjerto para el tratamiento y restauración de los defectos óseos.¹ La reconstrucción de defectos óseos es uno de los grandes problemas en cirugía maxilofacial y ortopedia.⁷ Los campos científicos en los que se investiga son: endoprótesis, osteosíntesis y biomateriales.¹²

La renovación o reparación de tejido óseo perdido, es conocida como osteorregeneración y se logra eficazmente gracias al empleo de biomateriales que producen osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis.⁸

El término biomaterial se emplea para designar materiales extraños al receptor, de origen natural o artificial, los cuales son implantados en un organismo viviente para restaurar la morfología y/o funciones de tejidos u órganos alterados por trauma, malformaciones o enfermedades degenerativas. Su característica principal es que deben funcionar bajo ciertas condiciones biológicas. Se diferencian de los fármacos en que su principal objetivo terapéutico, no es por un efecto químico en el organismo y en general no necesitan ser metabolizados. La biocompatibilidad ha sido definida como el estado de coexistencia mutua entre un biomaterial y el ambiente fisiológico, de modo tal que ninguno tenga un efecto indeseable por la existencia del otro.^{2,19}

El comportamiento funcional de un biomaterial se conoce como, biofuncionalidad y describe el comportamiento del material implantado en el organismo, lo que depende entre otros factores de: forma, uso, fatiga, fractura, fijación, reacciones tisulares, corrosión y sobrecarga entre otros. La forma es un factor importante tanto en biocompatibilidad como en biofuncionalidad. Un material en forma de polvo produce efectos completamente diferentes a los que produce el mismo material en forma de un sólido compacto.²

Se han utilizado numerosos materiales para la reconstrucción de los defectos óseos, tales como fosfato trícálcico, cerámicas de vidrio, titanio e hidroxiapatita entre otros; este último, es un mineral natural con composición similar a la del mineral óseo, siendo uno de los aspectos más importantes

of bone regeneration *in vivo* and coagulite is better than hidroxyapatite and coagulite-hidroxyapatite in osteoregeneration of experimental maxilla injuries in Wistar rats.

Key words: osteoregeneration, cellular adhesives, hidroxyapatite, Wistar rats maxilla, computed axial tomography, electron microscope scanner, hystologic analysis.

considerado para el desarrollo de biomateriales, ya que tiene las características del tejido a sustituir.¹⁵

La hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ha sido empleada como osteoconductora en el proceso de regeneración ósea; usualmente en la forma de gránulos porosos de diferentes tamaños. La hidroxiapatita utilizada como implante en defectos óseos periodontales, mostró aposición ósea directa y se observó parcial o totalmente cubierta dentro de hueso. El tamaño de la partícula y su forma, fueron reportados como de influencia significativa en la respuesta inflamatoria y en la formación ósea.¹¹

Otro biomaterial que ha sido empleado en términos de biocompatibilidad y regeneración tisular, es el sellador de fibrina. En la Universidad de Virginia se ha probado desde 1985, en más de 3,000 pacientes en una variedad de aplicaciones quirúrgicas, que constituyen el 5% de todas las operaciones cada año. Se ha utilizado en pacientes hemofílicos que se someten a extracciones dentales incluyendo a pacientes que han desarrollado inhibidor circulante del factor VIII o IX de la coagulación. En cirugía ortopédica, el sellador de fibrina se ha usado en la fijación de implantes, fijación de fracturas, inducción ósea (en combinación con otros factores de crecimiento), reparación de tendones, defectos articulares y para incrementar el crecimiento fibroblástico.¹³

Es importante señalar que algunos investigadores coinciden en mostrar a la colágena como elemento importante en la reorganización tisular. Gould y colaboradores señalan que la matriz de colágena dentinaria es un posible implante "universal" en periodoncia.⁹

Algunos de los selladores registrados son: Inmuno (Austria), Behring (Alemania) y CRTS-Lille (Francia). Se ha demostrado que la inhibición de la expresión de las integrinas, está involucrada en el descenso de adherencia osteoblástica a la matriz extracelular ósea.^{14,16,17}

Basados en estos resultados Ambriz y colaboradores (1990), desarrollaron en el Banco Central de Sangre (Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México), un hemostático local al cual se denominó coagulite, constituido por crioprecipitados (fibrinógeno y FXIII), trombina y ácido aminocaproico, para formación de coágulo *in situ* como adhesivo quirúrgico.¹⁶

Se eligieron ratas Wistar para este modelo experimental, porque ofrecen las ventajas de bajo costo de mantenimiento

y del conocimiento que se tiene de sus reacciones osteorregeneradoras.⁶ Y si para la osteorregeneración es necesario un biomaterial que tenga las características estructurales y fisiológicas del tejido a sustituir, entonces: ¿será posible que utilizando un biomaterial adhesivo celular como lo es el coagulite, se induzca la osteorregeneración más eficazmente? Estudios adicionales empleando adhesivos celulares, permitirán que fenómenos citológicos y moleculares en el microambiente, logren activar los mecanismos precisos necesarios para osteorregeneración.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la osteorregeneración en lesiones maxilares de ratas Wistar bajo la influencia de coagulite o hidroxiapatita o coagulite-hidroxiapatita, a través de análisis densitométrico, análisis de superficie y por análisis histológico como estándar de oro, con la finalidad de establecer cuál de los biomateriales antes mencionados es más eficaz.

Material y métodos

En esta investigación experimental prospectiva, se emplearon seis ratas Wistar de 350 g de peso, sanas, machos y de 24 semanas de edad. Las ratas Wistar aceptadas de acuerdo con los criterios de inclusión, fueron aleatorizadas según la tabla Million Random Digits with 100,000 normal desviates.

Para el proceso experimental fueron designadas de la siguiente forma:

Grupo 1. Cuatro cavidades experimentales realizadas en maxilar de la rata asignada con la clave M1, para implantar en A, coagulite (Co); en B, hidroxiapatita (HA); en C, coagulite-hidroxiapatita (Co-HA) y en D, sin tratamiento (control). Rata señalada para sacrificio a las tres semanas post-implantes.

Grupo 2. Cuatro cavidades experimentales realizadas en el maxilar de la rata marcada con M4, para implantar en A, Co; en B, HA; en C, CO-HA y en D, sin tratamiento. Para ser sacrificada a las seis semanas post-implantes.

Grupo 3. Cuatro cavidades experimentales realizadas en el maxilar de la rata designada como M6, para implantar en A, Co; en B, HA; en C, CO-HA y en D, cavidad sin tratamiento. Para sacrificio a las nueve semanas post-implantes.

Grupo 4. Cuatro cavidades experimentales realizadas en el maxilar de la rata señalada con la clave M2 para implantar en A, Co; en B, HA; en C, CO-HA y en D, sin tratamiento. Rata sacrificada a las doce semanas post-implantes.

Grupo 5. Cuatro cavidades experimentales preparadas en el maxilar de la rata M3, para implantes en A, Co; en B, HA; en C, CO-HA y en D, cavidad sin tratamiento. Rata sacrificada a las quince semanas post-implantes.

Grupo 6. Cuatro cavidades experimentales realizadas en el maxilar de la rata marcada con la clave M5. Se le implantaron de igual forma en A, Co; en B, HA; en C, CO-HA y en D, sin tratamiento. Animal experimental señalado como sustituto en cualquier fase experimental, con la finalidad de evitar la pérdida de información si alguno de los otros animales experimentales tuviese que ser eliminado.

Preparación de los biomateriales. A) La hidroxiapatita (sintética suiza en forma de gránulos porosos CEROS 80), fue

cortada de 2 x 2 mm formando gránulos homogéneos empleando un estereomicroscopio y posteriormente sometida a proceso de limpieza (dos fases de 1 minuto cada una, en agitador Penetron con agua desionizada) para eliminar las partículas de la misma que podrían actuar como cuerpos extraños.

B) Para la preparación de coagulite: Se utilizan dos jeringas de 5 ml, en una se mezclan los crioprecipitados (plasma fresco congelado grupo AB,⁴ por el método de congelación y descongelación rápida) 5 ml, con 3 ml (750 mg) de ácido aminocaproico (frasco de 5 gramos) y 50 U de trombina disuelta en 2 ml de solución salina.

Cirugía. Las ratas fueron anestesiadas con zolazepam y tiletamina (50 mg/ml), de acuerdo a su peso, la dosis total fue de 0.4 ml. Se realizaron 4 perforaciones (dos perforaciones en maxilar derecho y dos en maxilar izquierdo; con una separación de 1 cm aproximadamente entre cada una de ellas). La primera perforación (A), se localizó en la unión cigomático-maxilar derecha; la segunda (B), entre el primero y segundo molares del mismo maxilar; la tercera perforación (C), en la unión cigomático-maxilar izquierda y la cuarta (D) control, entre el primero y segundo molares del mismo maxilar, a 2 mm aproximadamente del borde gingival.

Incisiones. Previa esterilización del instrumental quirúrgico y siguiendo las normas de asepsia y antisepsia en cirugía, se empleó la técnica Semi-Newman para abordaje quirúrgico de las zonas antes señaladas. A cada animal se le incidió en el borde gingival hasta llegar al hueso maxilar, se retiró el periostio. Con fresa de bola de carburo No. 2 (Union Broach), se realizaron cuatro cavidades de aproximadamente 2 mm de diámetro por 2 mm de profundidad cada una y se implantaron los biomateriales objeto de esta investigación. Se colocó en las cavidades maxilares antes mencionadas A (coagulite); B (hidroxiapatita); C (coagulite-hidroxiapatita); y D (para control, sin material). Se aplicó de la mezcla de crioprecipitados 0.2 ml y de la trombina 0.1 ml con jeringas de insulina dentro de las perforaciones designadas para este biomaterial (A). El contenido de ambas jeringas se vertió simultáneamente sobre la cavidad maxilar.¹⁶

Tomografía computarizada (TAC). Para estandarizar las lecturas, se realizó un estudio piloto, se colocaron las ratas en el tomógrafo (Shimadzu SCT 5000 T) en posición abdominal hacia el sillón, extendiendo las patas delanteras y traseras; la computadora del tomógrafo permitió establecer las dimensiones de las lecturas y los niveles de corte en las densitometrías obtenidas de los maxilares, a través de la computadora.

A tres semanas de realizar los implantes, la rata que por designación fue señalada con la clave M1; se anestesió para examen con TAC. Posteriormente fue sacrificada utilizando cloroformo de acuerdo a las normas internacionales de bioética en animales de experimentación. Inmediatamente después se realizó disección de maxilar y se colocó en formol al 10% para su procesamiento y observación en microscopio electrónico de barrido. El mismo procedimiento fue realizado para las ratas de las claves M4, M6, M2 y M3.

Microscopía electrónica de barrido (MEB).

Se extrajeron los maxilares y se fijaron en formalina procediéndose a la deshidratación: a) en alcohol etílico en

forma gradual y ascendente hasta llegar a 100%; de diez en diez con tiempo de 20 minutos por cada concentración; b) se llevaron los maxilares a desecación a punto crítico en un aparato de marca Samndri-780^a, llegando a 31°C, ya que la misma pieza sería tratada de forma reversible para estudio histológico; y c) ionización en un ION SPUTTER JFC-1100 (película de oro uniforme de 2 nm aproximadamente).

Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido (Jeol JM560 40x). El análisis de superficies sirvió para identificar si hubo morfodiferenciación y/o lleno de las zonas internas o adyacentes a las cavidades (llenado de los defectos). Se estableció que de acuerdo a la osteorregeneración de las cavidades se designaran los siguientes valores: cavidad vacía, marcaría un valor 0; cavidad con 1/4 de llenado obtendría el valor de 1; cavidad con 1/2 de ocupación, sería señalado con el valor 2; cavidad con 1/3 de lleno en la cavidad marcaría un valor de 3 y, finalmente la cavidad con un lleno completo obtendría el valor de 4.

Método de preparación histológica para observación en microscopio fotónico. Una vez analizados por MEB, los maxilares M1 (a 3 semanas de sacrificio), M4 (a seis semanas), M6 (a 9 semanas), el M2 (a 12 semanas de sacrificio) y el M3 (a 15 semanas de sacrificio), fueron procesados para rehidratar el material de estudio (técnica descrita por Antuna Bizarro y Molina 2000); la siguiente fase experimental empleada fue la técnica histológica convencional. Previa descalcificación con ácido nítrico al 5%, se colocaron en solución saturada de hiposulfito de sodio para neutralizar la descalcificación y finalmente se dejaron en formol al 10%. Se procedió a la deshidratación en alcohol al 80% (1 hora), alcohol del 96% (en tres pasos de 1 hora cada uno), alcohol etílico absoluto (2 pasos de 1 hora cada uno), alcohol-xilol (1 hora), xilol (dos pasos de 1 hora cada uno) e impregnación de parafina (2 pasos de 1 hora cada uno). La temperatura de la parafina fue de 58°. Todo el proceso se realizó en un Histoquinette. Se realizaron cortes histológicos de 4 a 6 mm aproximadamente y tinción con hematoxilina-eosina.

La morfodiferenciación por presencia o ausencia de líneas de segmentación, osteoblastos y el nivel de maduración ósea en muestras teñidas con hematoxilina-eosina, fueron evaluados con un fotomicroscopio (Olympus 3HDF). Se analizaron todos los especímenes obteniendo 250 cortes por cavidad para análisis histológico sólo de los marcados con las claves M4, M2 y M3.

Métodos para el análisis estadístico. El método para el análisis estadístico de los datos obtenidos por TAC fue el análisis de varianza (ANOVA). Los grupos a comparar en diferentes eventos permitieron que este análisis mostrara las diferencias, que podrían ser enmarcadas dentro de una curva normal de comportamiento de acuerdo al cambio en densidad mostrado por los biomateriales en las diferentes semanas. Esto se logró después de obtener el valor de referencia en densitometría que para maxilares de ratas Wistar es de 750-850 UH en condiciones normales en densidad ósea.

Para evaluar la eficacia de los biomateriales postimplantados a 3, 6, 9, 12 y 15 semanas con MEB, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis.

Los resultados obtenidos a través de una variable cualitativa ordinal y por ende la necesidad de una prueba de alta potencia, nos llevaron a seleccionar este tipo de análisis estadístico.

Resultados

Tomografía axial computarizada. Las densitometrías obtenidas mostraron que a las 3 semanas el biomaterial que alcanzó el valor densitométrico más alto fue la combinación coagulite-hidroxiapatita (C), con 903 UH; el siguiente valor más alto fue el alcanzado por la hidroxiapatita (B), 667 UH; después el coagulite (A), 489 UH (*Figura 1*) y por último el control (D), 228 UH.

A las seis semanas, el biomaterial con la densitometría más elevada fue el coagulite-hidroxiapatita (C), 900 UH; el siguiente fue la hidroxiapatita (B), 841 UH; después el coagulite (A), 537 UH y finalmente el control (D) con 346 UH.

A las 9 semanas el biomaterial con la densitometría más alta fue la mezcla de coagulite-hidroxiapatita con 930 UH, después la hidroxiapatita con 858 UH; el coagulite con 675 UH y finalmente el control con 484 UH.

A las doce semanas el valor densitométrico más elevado fue obtenido en la hidroxiapatita (B), 1048 UH; el siguiente fue la mezcla coagulite-hidroxiapatita (C), con 844 UH; le siguió el coagulite (A), 831 UH y por último el grupo control con 853 UH.

El valor densitométrico más parecido a los “valores de referencia” (en los maxilares de ratas Wistar 750-850 UH) es alcanzado desde las tres semanas por la combinación coagulite-hidroxiapatita (C), 903 UH. También fue alcanzado a las seis semanas por la hidroxiapatita (B), 841 UH.

Los materiales simples (coagulite e hidroxiapatita); así como la mezcla (coagulite-hidroxiapatita), muestran densitometrías mayores a las obtenidas por el control a las 3, 6 y 9 semanas.

El biomaterial coagulite-hidroxiapatita), mantiene niveles por arriba de los “valores de referencia” desde las 3 semanas hasta las 12 semanas. La hidroxiapatita a partir de la sexta semana.

El análisis de varianza (ANOVA) muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los biomateriales con una $p < 0.018$ (*Figura 2*). Se aplicó la postprueba Tukey que describe donde están las diferencias. Con la variable dependiente densitometría, la mezcla presentó la mejor diferencia en relación al control, con un intervalo de confianza del 95% y con una significancia de $p < 0.025$; tomando en cuenta que la diferencia entre las medias es significativa al nivel $p < 0.05$, le sigue en significancia la HA con una $p < .045$.

Microscopía electrónica de barrido. El análisis en MEB mostró la morfodiferenciación y osteorregeneración en las zonas internas o adyacentes a las cavidades (llenado de los defectos). Se capturó la información en la tabla diseñada para esta investigación. El análisis de superficies logrado con microscopía electrónica de barrido MEB mostró los siguientes resultados:



Figura 1.Imagen de TAC que muestra la densidad obtenida del maxilar M6 en la cavidad D.

La cavidad experimental M1C (coagulite-hidroxiapatita), analizada a las 3 semanas por MEB, obtuvo osteorregeneración con un valor de 2 en las marcadas con A (coagulite, Co B (hidroxiapatita, HA) y el control (sin tratamiento), obtuvo un valor de 0.

La cavidad experimental marcada con la clave M4C (Co-HA) observada a las seis semanas para MEB, mostró osificación completa de la cavidad mientras que; la M4A (Co) y M4D (control), obtuvieron un puntaje de 2; es decir, la mitad de la cavidad ocupada por hueso a las mismas semanas. Mientras que la M4B, obtuvo una ocupación ósea con valor de 1.

Las cavidades M6A (Co) y M6C (Co-HA) a las 9 semanas se observaron totalmente osteorregeneradas, con un puntaje de 4. La M6B (HA) ocupó las 3/4 partes de la cavidad con hueso, obteniendo un puntaje señalado para este efecto de 3



Figura 3.Micrografía que muestra las cavidades experimentales C, tratada con la mezcla (Co-HA) y D sin tratamiento. Se observa la diferencia en la ocupación ósea de las lesiones a las doce semanas.

y; la M6D (control) un 1/2 en la ocupación ósea de la cavidad para una puntuación de 2.

Las cavidades experimentales evaluadas a las doce semanas: M2A, M2B y M2C (*Figura 3*), marcaron un puntaje de 4; es decir, totalmente osteorregeneradas. El control M2D, con un valor 2.

Las cavidades experimentales evaluadas a las 15 semanas: M3A, M3B (*Figura 4*) y M3C (*Figuras 5 y 6*), tuvieron un valor 4, y el control un valor de 3, en la ocupación ósea.

El biomaterial que mejor puntaje obtuvo para osteorregeneración en este análisis, fue el logrado por la mezcla (Co-HA). En segundo lugar el coagulite, el tercero la hidroxiapatita y por último el control. Sin embargo la osteorregeneración observada en análisis de la superficie de la cavidad experimental tratada con el coagulite, mostró ser más pareci-

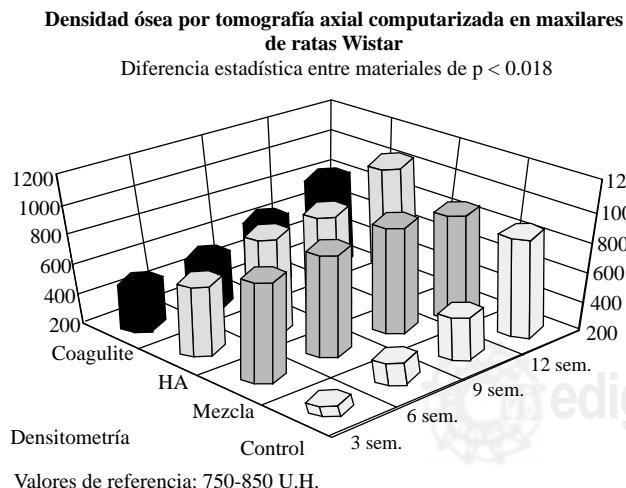


Figura 2.Gráfica que muestra el comportamiento densitométrico de los biomateriales a las diferentes semanas.

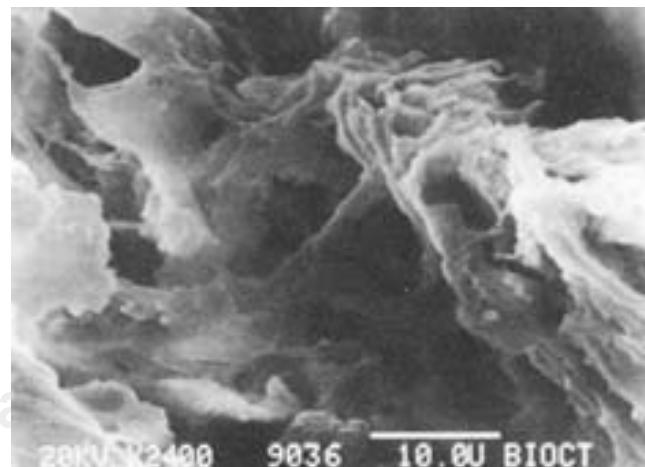


Figura 4.Micrografía que muestra acercamiento de la cavidad experimental M3, tratada con hidroxiapatita. Se observa trabeculado óseo con material fibroso.

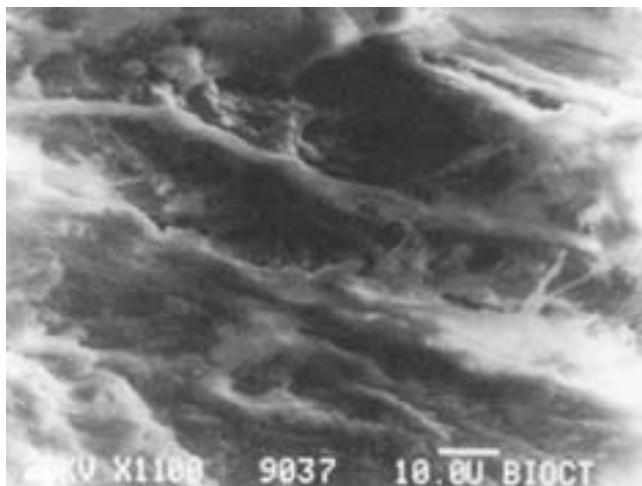


Figura 5. Micrografía que muestra acercamiento de la cavidad experimental M3, tratada con la mezcla (Co-HA). Se observan fibras de mediano y grueso calibre (flechas).

da a la normalidad ósea. La prueba Kruskal-Wallis mostró diferencia estadística significativa con 3 grados de libertad y la variable de agrupación: semanas. Se obtuvo una $p < 0.039$.

Microscopía fotónica. Argumentación histológica para osteorregeneración. Después de analizar 150 cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, de 4 a 6 mm aproximadamente, de maxilares de ratas Wistar tratadas con los biomateriales: coagulite, hidroxiapatita, coagulite-hidroxiapatita y control (sin tratamiento); dentro de 4 cavidades preparadas para su implantación, en cada maxilar y señalados o designados para este efecto, se observó lo siguiente: la variable morfológica (tejido óseo). El tratamiento en M1 con A-coagulite (Co) condicionó los siguientes cambios: espesor trabecular claro y líneas de segmentación que sugieren actividad osteoblástica. En M1 con B-hidroxiapatita (HA): pa-

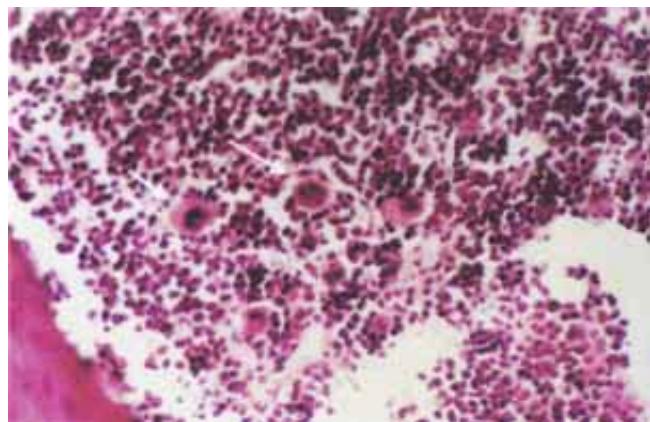


Figura 7. Fotomicrografía en la que se observa médula ósea activa con 5 megacariocitos (flechas). (HE aumento original 250X).

trón trabecular intermedio. Predomina más lo compacto que lo trabecular; sin embargo, la compactación sugiere que no ha terminado. En M1 con C-coagulite-hidroxiapatita (Co-HA): el proceso de maduración ósea muestra un avance, en comparación al encontrado en M1B. Pocas líneas de segmentación. En M1D (sin tratamiento): el espesor trabecular más claro, presenta líneas de segmentación que sugieren actividad osteoblástica.

En M4 con A (Co): zona de lesión previa a reparación, trabeculado óseo en estrato intermedio. Se observaron células polimorfonucleares y macrófagos e hiperplasia del cemento radicular adyacente a la zona. En M4 con B (HA): material calcificado pero no muestra que estimule osificación. Espículas óseas en desorganización y macrófagos. En M4 con C (Co-HA): material calcificado. Zona de lesión en fase de limpieza o de reabsorción (macrófagos) en zona de lesión. En M4 con D (sin tratamiento): hueso trabecular de neoformación en estrato intermedio.

En M2 con A (Co): resorción de tejido óseo y reacción inflamatoria (eosinofilia) que sugiere reparación ósea (*Figura 7*). Vasos con eritrocitos previamente constituidos con edema. Demuestra una buena reparación, tiene los elementos necesarios para nutrirse y regenerar tejido. En M2 con B (HA): zona de lesión con reacción a cuerpo extraño, células redondas (histiocitos) y células gigantes. Zona violácea que sugiere precipitación cárlica de tipo distrófico. En M2 con C (Co-HA): sustitución de tejido cicatrizal, reacción inflamatoria de tejido conectivo y neoformación vascular. Pérdida de vascularidad en algunas zonas causado posiblemente por empaquetamiento del material. Calcificación distrófica.

Discusión

En este estudio se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa en la osteorregeneración temprana entre los biomateriales comparados en esta investigación. Mostró que el coagulite es más eficaz en la osteorregeneración aún a pesar de que la mezcla y la hidroxiapatita lograron los mejores resultados en la evaluación con tomografía axial

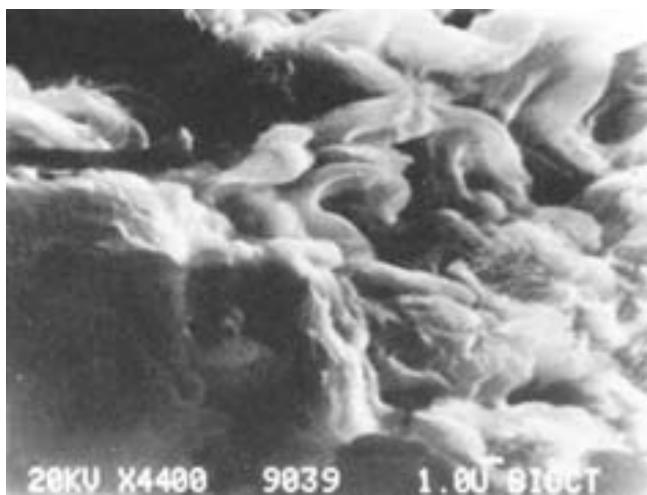


Figura 6. Micrografía que muestra acercamiento de la cavidad M3C, se observa material amorfo que sugiere ser colágeno.

computarizada CAT. Esto fue corroborado en el análisis de superficie realizado con microscopía electrónica de barrido MEB, en donde se observan superficies osteorregeneradas más parecidas a maxilares en estado de normalidad ósea.

Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas y mejor aún, cada lesión fue evaluada por tres instrumentos de medición, optimizando los recursos y controlando las variables propias de una investigación en animales de experimentación.

Se han realizado numerosas investigaciones tratando de encontrar el biomaterial ideal en la osteorregeneración temprana; sin embargo, aún existen muchos aspectos desconocidos en esta búsqueda.^{6,10} A la fecha ningún otro material adhesivo biológico o sintético como lo son los selladores de fibrina han sido tan usados en los términos de compatibilidad tisular, no tóxicos y de beneficios clínicos.¹⁶

Muchos investigadores han observado los beneficios clínicos de los selladores de fibrina pero estos estudios no han sido desarrollados bajo condiciones bien controladas.^{16,17} Esta investigación se estructuró de forma que las cavidades experimentales y el control presentaran las mismas condiciones en su preparación. La implantación de los biomateriales en las cavidades señaladas fueron realizadas en un mismo individuo evitando así los sesgos en las observaciones relacionados a inmunidad del sujeto experimental y por lo tanto, sesgos en el análisis de las diferencias.

Las similitudes en los procesos de osteorregeneración o formación de los tejidos duros prueban que la naturaleza ofrece muchas respuestas. Imitando estos fenómenos naturales, se comparó la eficacia en la osteorregeneración temprana del coagulite, biomaterial que coloca en el defecto las sustancias necesarias que aceleran éstos y logran hacer efectiva la ingeniería tisular.

Al igual que Gould y colaboradores, se observó en esta investigación que la colágena juega un rol importante en la reorganización tisular.⁹

Se asume que existe una correlación entre el arreglo de fibronectina y el porcentaje de células en la investigación de Gril y cols.¹⁰ En éste, existieron diferencias entre los materiales, situando mayor contenido celular donde eran abundantes las fibras. Se observó este fenómeno con mayor frecuencia en las cavidades en las que se colocó el coagulite.

En estudio realizado por Chandrasekhes S. y colaboradores refieren que la migración celular es un evento clave en la reparación, remodelación tisular y homeostasis cálcica. Reacción del estroma, células inflamatorias, elementos sanguíneos, trabeculado laminar frecuentemente cuboidal con citoplasma basófilo fue la forma representativa de un estado metabólico activo.⁶ En este estudio, la mezcla mostró ser favorable en la osteoconducción ya que proporciona la estructura y favorece la comunicación entre las superficies vascularizadas, sirvió de soporte. Se observaron conglomerados celulares descansando sobre el trabeculado de la hidroxiapatita. Con la tinción de hematoxilina-eosina se observó actividad metabólica alrededor de lagunas que sugieren actividad osteoblástica.

El tamaño de la partícula y la forma tienen una influencia significativa en la respuesta inflamatoria. En este estudio los implantes de hidroxiapatita fueron llevados a fase de limpieza para eliminar partículas que incrementaran la respuesta inflamatoria.¹¹

Los resultados obtenidos con F. García de Lucas y cols., muestran que el uso de un osteoconductor y un polímero son más eficaces en la osteorregeneración, que el empleo de un polímero simple.⁷ En este estudio la mezcla coagulite-hidroxiapatita logró los valores densitométricos más altos en osteorregeneración temprana. Sin embargo, desde las 3 semanas muestra valores por arriba de los "valores de referencia" ("valores de referencia" = valores densitométricos promedio de maxilares de ratas Wistar en condiciones normales).

En microscopía electrónica de barrido SEM, el análisis de superficie mostró una masa ósea que sobresale de la superficie del maxilar. El coagulite mostró con SEM la superficie osteorregenerada más parecida a la observada en condiciones normales.

Se emplearon crioprecipitados del grupo sanguíneo AB para evitar reacciones cruzadas en los animales de experimentación.⁵

La migración celular es importante durante la fase de maduración y está asociado a la presencia de fibronectina, esto fue observado en el estudio de Schick y cols.¹⁷ En este estudio se observó osteorregeneración temprana en las lesiones tratadas con coagulite.

Es importante señalar que la tomografía axial computarizada es una alternativa para evaluar osteorregeneración. No obstante, es necesario analizar con detalle los valores densitométricos que se obtienen; y así, no cometer errores en su interpretación. El control con otros estudios de gabinete, siempre serán de gran importancia para hacer diagnósticos diferenciales en los casos donde existan dudas del comportamiento densitométrico.

Conclusiones

El coagulite mostró mejorar la osteorregeneración desde las 3 semanas; comparado con el control cuando fue analizado por TAC y por MEB. Y lo más importante, mostró obtener los mejores resultados de semejanza a la normalidad que la hidroxiapatita y el coagulite-hidroxiapatita en los análisis de superficies realizadas por MEB y los obtenidos por el análisis histológico (estándar de oro).

El coagulite-hidroxiapatita mostró los mejores resultados en la osteorregeneración temprana de lesiones maxilares de ratas Wistar que el coagulite o la hidroxiapatita en resultados obtenidos por TAC; sin embargo, en las observaciones por MEB, sobrepasa los límites de la superficie necesarios para una osteorregeneración lo más parecida a la normalidad. La hidroxiapatita logró el tercer sitio de eficacia en la osteorregeneración de este estudio. Se concluye que la hipótesis de trabajo fue correcta; el coagulite es más eficaz en la osteorregeneración en lesiones maxilares de ratas Wistar, que la hidroxiapatita y el coagulite-hidroxiapatita.

Comentarios

Esta investigación tendrá un impacto social muy favorable en defectos óseos que requieran cirugía maxilofacial, endodóntica, cirugía periodontal y en traumatología; ya que los resultados de ésta indican la posibilidad del empleo de un biomaterial que puede ser obtenido de forma autóloga y que de ser así, disminuirá costos y problemas de reacciones adversas ocasionados por otros biomateriales. Repercusiones en los campos de endoprótesis y osteosíntesis, así como en la ciencia de los biomateriales.

Agradecimientos

A la hisotecnóloga Guadalupe Yescas Díaz por su valiosa colaboración en los cortes histológicos de este trabajo. Al M en C Enrique Sampedro Carrillo, quien realizó los diagnósticos histológicos para la culminación de esta investigación. Al MVZ Julio González G. Responsable del Bioterio de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM y a la Matemática Margarita Jiménez Villarruel, de la Unidad de Informática del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, por sus atinados consejos para efectuar el análisis estadístico.

Bibliografía

1. Baracaldo C, Padilla A, Santana W, Buitrago F. Biomateriales. Biomat.html en fuantitan.uanarino.edu.co -Explorador de Internet de Microsoft 1997.
2. Barbosa HA. Biomaterial degradation: fundamental aspects and related clinical phenomena. Elsevier Science Publishers BV 1991: 1-11.
3. Brown LF, Lanir N, Mc Donagh J, Tognazzi K, Dvorak HF. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. Am J Pathol 1993; 142: 273-83.
4. Brown WP, Constantz B. Hidroxyapatite and related materials. CRC Press, Inc 1994: 3-22.
5. Bull RW. Animal blood groups: and you thought people were complex or Doolittle's friends may not be your type. American Association of Blood Banks technical workshop on veterinary transfusion Medicine 1989: 2-10.
6. Chandrasekhar S, Harvery AK. Modulation of PDGF mediated osteoblast chemotaxis by leukemia inhibitory factor (LIF). J Cell Physiol 1996; 169: 481-90.
7. García de LF, De Pedro JA, López BA, San Román J, Cuadra-dio MA, Pérez-Caballero AJ, López-Durán L. Osteorregeneración inducida por biomateriales y BMP en defectos diafisarios. Rev Ortop Traum 1995; 39: 443-56.
8. González SR, Guerra LGJ. Materiales bioactivos para implantes óseos. Características y aplicaciones. CENIC. La Habana, Cuba 1993.
9. Gould TR, Westbury L, Tillman J. Dentin matrix gelatin (DMG) as a possible "universal" grafting material in periodontics. J Periodontol 1982; 53: 22-5.
10. Grill V, Sandrucci MA, Basa M, Di Lenarda R, Dorigo E, Martelli AM, Bareggi R, Narducci P. The presence of implants materials influences fibronectin arrangement and cell growth in fibroblast cultures. Boll Soc Ital Biol Sper 1996; 72: 87-94.
11. Higashi T, Okamoto H. Influence of particle size of hidroxia-patite as capping agent on cell proliferation of cultured fibroblasts. J Endod 1996; 22: 236-9.
12. Merck Pharma * Biomateriales. <http://www.merck.de/Pharma/Biomaterial.ES.html-11> Feb 97.
13. Mintz DP. Transfusion therapy: clinical principles and practice, American Association of Blood Banks 1999: 199-212.
14. Nagahara K, Mouuri K, Kanematsu N, Meenaghan MA. An *in vitro* evaluation of an osteoinductive implantable material produced by osteoblastic cells *in vitro*. Int J Oral Maxillofac Implants 1994; 9: 41-8.
15. Pitt FTR, Torabinejad M, McKendry DJ, Chan-U Hong, Kadawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. Oral Surg Oral Medicine Oral Pathology 1995; 79: 756-63.
16. Quintana S, Martínez M, Ambríz R, Collazo J, Domínguez V, Quintanar E, Rodríguez M, Arias A. Hemostasia local en hemofilia (coagulite). Memorias del Simposio del Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS México 1997: 113-9.
17. Radosevich M, Goubran HA, Bumouf T. Fibrin sealant: Scientific rationale, production methods, properties, current clinical use. Vox Sang 1997; 72: 133-43.
18. Schick PK, Wojenski CM, Bennetts VD, Ivanova T. The synthesis and localization of alternatively spliced fibronectin EIIIIB; in resting and thrombin-treated megakaryocytes. Blood 1996; 87: 1817-23.
19. Williams FD. Fundamental aspects of biocompatibility. Vol 1, CRC Press, Inc 1991: 3.

