

Artículo original

Caracterización de hueso de bovino anorgánico: Nukbone

María Cristina Piña Barba,* Nadia Murguía Acevedo,**
Roberto Palma Cortés,*** Enrique Lima****

Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN. El objetivo de este trabajo es la caracterización de implantes de hueso poroso anorgánico de bovino proveniente del cóndilo femoral distal y preparados con una tecnología desarrollada en el Instituto de Investigaciones en Materiales-UNAM. Para ello se realizó el análisis químico elemental, se midió la concentración de elementos tóxicos así como el contenido de materia orgánica y se llevaron a cabo las pruebas de esterilización. Los implantes cumplieron con todos los requisitos exigidos por los estándares de la ASTM (American Standard Testing Materials) por lo que pueden ser usados en la práctica médica.

Palabras clave: biomateriales, hueso de bovino, hueso anorgánico, xenoinplante.

SUMMARY. The purpose of this paper is to characterize bovine anorganic porous bone implants harvested from the distal femoral condyle and processed with a technology developed at the Materials Research Institute, National Autonomous University of Mexico. With this end, the elemental chemical analysis was done, toxic element concentrations and the organic matter content were measured, and sterilization tests were performed. The implants complied with all the requirements of the American Society for Testing and Materials (ASTM) and thus they can be used in medical practice.

Key words: biomaterials, bovine bone, anorganic bone, xenograft.

Introducción

Cuando se trata de remediar problemas óseos como los causados por defectos congénitos o los resultantes de infecciones, traumas o resección de tumores óseos, se emplean injertos o implantes por su bajo costo,¹ en el futuro

se empleará ingeniería de tejidos, campo que se está desarrollando con mucha velocidad en todo el mundo y que aún no se aplica a gran escala por su alto costo.

Los injertos de hueso esponjoso son de mucha ayuda, ya que promueven la curación por osteoinducción y osteoconducción, facilitando y acelerando la curación, ya que cuentan con todas las características esenciales de un material de implante como resistencia mecánica y osteoblastos vivos. La osteoinducción es el proceso por el cual las células osteoprogenitoras son persuadidas y estimuladas por medio de factores de crecimiento y diferenciación para formar hueso nuevo. Mientras que la osteoconducción consiste en el reclutamiento y la migración de células osteogénicas y nuevos capilares a través de una matriz tridimensional para su regeneración.^{2,3}

De entre los injertos de hueso poroso, el mejor es el autólogo, es decir, hueso que proviene de la misma persona a quien se le aplica, pues se reduce el riesgo de rechazo, aumentando las posibilidades de curación. Hasta ahora, el injerto autólogo es considerado el material por excelencia y puede ser usado como el estándar de oro contra el cual se comparan los otros materiales que se emplean con los mis-

* Doctora en Ciencias, Investigador Titular B, Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM.

** Química, Técnico Académico Titular C, Facultad de Química, UNAM.

*** Maestro en Ciencias, Biocriss SA de CV.

**** Doctor en Ciencias. Postdoctorante del Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM.

Dirección para correspondencia:

Dra. Ma. Cristina Piña Barba. Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM. Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria A.P. 70-360 México, 04510 D.F., México.

Tel. 56224657 y/o 56224641, Fax: 56161371

E: mail: mcpb@servidor.unam.mx

mos fines. Sin embargo, tiene la desventaja de implicar una doble cirugía para el paciente con todos los riesgos que esto conlleva como son: mayor dolor, pérdida de sangre, riesgos de infección, así como de trombosis y fractura del hueso de donde se toma el injerto, además está la limitante de la disponibilidad de este tejido, ya que se puede requerir mucho más de lo que se puede obtener, especialmente en niños.

Debido a estas dificultades, se busca un material alternativo que cumpla con todos los requisitos de biocompatibilidad establecidos y que además esté ampliamente disponible. Ese material puede provenir de individuos diferentes de la misma especie receptora y se denominan implantes alogénicos.

Si el material de los implantes se obtiene de individuos de especie diferente a la receptora, a los implantes se les conoce como implantes xenogénicos o xenoimplantes.

Un material que se ha propuesto para la realización de xenoimplantes para tejido óseo es la matriz ósea proveniente de hueso de bovino. Esta matriz está constituida por cristales nanométricos de hidroxiapatita (HA) depositados sobre colágena tipo I, composición que es igual en todos los mamíferos.

El hueso poroso al que se le ha retirado toda la materia orgánica quedando únicamente conformado por la matriz ósea se conoce como hueso anorgánico o desproteínizado y ha resultado ser útil en el campo de los implantes xenogénicos, el proveniente del cóndilo de bovino posee una porosidad que va de las 200 μm a 2 mm, y es la adecuada para permitir el crecimiento de tejido óseo.⁴ Por no contener material orgánico, estar formada de hidroxiapatita y tener una estructura porosa adecuada cumple con los requisitos de ser biocompatible. La matriz ósea o hueso anorgánico presenta cohesividad y fuerza estructural alta, su disponibilidad en tiempo y cantidad es elevada, su único inconveniente como implante es que sólo puede ayudar a la curación del tejido óseo por osteoconducción.

El implante xenogénico o xenoimplante de hueso poroso proveniente del cóndilo de bovino logrado en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM se denominó "Nukbone" y se puede maquilar para lograr diferentes formas geométricas que pueden ser muy simples como cubos o muy complejas como tornillos especiales.

Para que un material pueda ser empleado como implante, se requiere que cumpla con una serie de requisitos marcados en las normas internacionales. En este trabajo se llevó a cabo la caracterización físico química de "Nukbone" bajo las especificaciones estipuladas por la American Society for Testing and Materials (ASTM).⁵

Entre los requisitos físico-químicos marcados por ASTM para el estudio de un xenoimplante, se deben considerar los siguientes parámetros:

1. Cantidad de calcio (Ca) y fósforo (P) y la relación Ca/P de la muestra determinada mediante análisis químico fundamental. Para hueso se espera obtener: $1.4 < \text{Ca/P} < 4.0$.⁶

2. Concentración de elementos considerados altamente tóxicos como son arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) cuya concentración en un material de implante no debe sobrepasar los siguientes límites: 3 ppm (partes por millón) para As, 5 ppm para Cd, 5 ppm para Hg, 30 ppm para Pb.⁷ Esto se hará mediante espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).
3. Composición del material, en este caso por hidroxiapatita, carbonatos y fosfatos de calcio puros, determinado por difracción de rayos X (DRX).⁸
4. Grupos funcionales presentes en el material, deben identificarse por Análisis de Infrarrojo (IR).⁹
5. Contenido orgánico del material, el cual se determina por análisis termogravimétrico (TGA) y análisis termodiferencial (ADT).¹⁰

Además de los anteriores requisitos, en este trabajo se determinó el intervalo de tamaño de poros por microscopía electrónica de barrido (MEB) y además se comprobó que "Nukbone" se puede esterilizar por completo empleando radiación gamma.

Material y métodos

Obtención del material

Para eliminar las proteínas del hueso esponjoso se emplean detergentes iónicos y proteasas, previa remoción de las grasas usando calor. La forma del implante se logra moldeando el material mecánicamente, después se limpia empleando un baño de ultrasonido con agua desionizada, se seca en horno de microondas y finalmente se esteriliza empleando radiación gamma.¹¹ Una vez retirada la materia orgánica de los poros, lo que se tiene es un hueso anorgánico al que se denominó "Nukbone", (Figura 1).



Figura 1. Hueso anorgánico obtenido en el Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, y denominado "Nukbone".

El proceso de obtención del material se desarrolló en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Caracterización

Se empleó la técnica de espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) para determinar las cantidades de Ca, P, As, Cd, Pb, Hg y la razón Ca/P de modo directo. El análisis químico elemental se llevó a cabo con un equipo Optima 4300DV (Perkin Elmer Co USA) utilizando el detector de estado sólido y el nebulizador de altos sólidos. Ca y P se analizaron utilizando la visión radial mientras que el As, Cd, Hg y Pb con la visión axial. Previamente las muestras se digirieron en horno de microondas y en baño maría considerando tres medidas como mínimo para cada muestra y se emplearon tres muestras diferentes en cada caso. El programa usado para el horno de microondas fue Bone PAAR 001H.

Se obtuvieron los patrones de difracción de rayos X de las muestras obtenidas empleando un equipo Bruker AXS (Diffractometer Plus/D8 Advance), usando la radiación de CuK α (1.5418 Å), a 35 kV y 30 mA. Se compararon estos patrones con los de HA, calcita, fosfato cálcico, whitlockita y monetita.

Para determinar el contenido orgánico del material se emplearon las técnicas de análisis térmico gravimétrico (ATG) y análisis térmico diferencial (ATD) empleando un equipo Hi-Res TGA 2950 (Thermo Gravimetric Analyzer). Se prepararon 50 mg de muestra, los cuales se colocaron en un crisol de platino que fue sometido a una rampa de temperatura de 10°C/min en atmósfera de nitrógeno.

Para determinar los grupos funcionales del Nukbone, se prepararon 50 mg de una solución sólida al 99% en peso de bromuro de potasio (KBr) y 1% en peso de la muestra a los que se les aplicó una presión de 6 toneladas para obtener una pastilla de 6 mm de diámetro que es colocada en

el equipo de Infrarrojo FTIR Nicolet 510P, corriéndose en transmisión.

El intervalo de tamaño de poros se determinó mediante el estudio de la microestructura del hueso desproteínizado por MEB¹² empleando un Leica Cambridge Stereoscan 440.

Para probar que el método de esterilización es el correcto, se emplearon cuatro cubos de hueso de 2 x 2 x 2 mm a los que se sometió a una dosis de 2.5 Mrads de radiación gamma.¹³ Dos de ellos fueron colocados en una solución de tioglicolato e incubados desde 30°C a 35°C por 14 días, mientras los otros dos fueron colocados en un medio de cultivo de triptocaseína de soya e incubados de 20°C a 25°C durante 14 días, si la técnica de esterilización no es la correcta habrá proliferación bacteriana.

Resultados y discusión

El proceso empleado para la obtención del hueso anorgánico no emplea sustancias que dañen la arquitectura del material como sosas y desengrasantes orgánicos que dejan residuos tóxicos, además el implante no pierde su resistencia mecánica ni su estructura, por lo que su calidad es alta.

La *figura 1* muestra algunos ejemplares del hueso anorgánico y puede apreciarse la ausencia de material orgánico de las muestras, así como su porosidad. Con el material así obtenido se pueden elaborar diferentes figuras y su tamaño está limitado por el tamaño del cóndilo de bovino.

Los resultados del análisis químico elemental se muestran en la *tabla 1*, se indican los tratamientos empleados para la digestión de la muestra en baño maría y horno de microondas, siendo este último el mejor, debido a que es más reproducible y presenta, en consecuencia, una menor desviación estándar. De los valores reportados en la *tabla 1* puede considerarse que la relación Ca/P está dentro de los límites marcados por la ASTM; cabe mencionar que para la HA estequiométrica este valor es de 1.6.

Tabla 1. Medida de la cantidad de los diferentes contaminantes encontrados en el hueso de bovino después de procesado.

Muestra	Tratamiento	Pb µg/g	Cd µg/g	Fe µg/g	As µg/g	Hg µg/g	P µg/g	Ca µg/g	Ca/P
Límite aceptado por ASTM		9.499	1.582		0.949	1.582			De 1.4 a 4
Nukbone	HMO								
	5 mL HNO ₃	10.52 ±	0.930 ±	8.18 ±	0.116 ±	ND	116.35 ±	242.2 ±	2.08
	3 mL H ₂ O ₂	0.20	0.01	0.37	0.006		1.40	3.22	
	0.5 mL HCl								
Nukbone	B.Ma								
	3.5 mL HNO ₃	8.341 ±	0.862 ±	9.932 ±	0.121 ±	ND	120.86 ±	251.95 ±	2.08
	2.5 mL H ₂ O ₂	0.30	0.03	0.65	0.010		3.53	5.33	
	0.2 mL HCl								

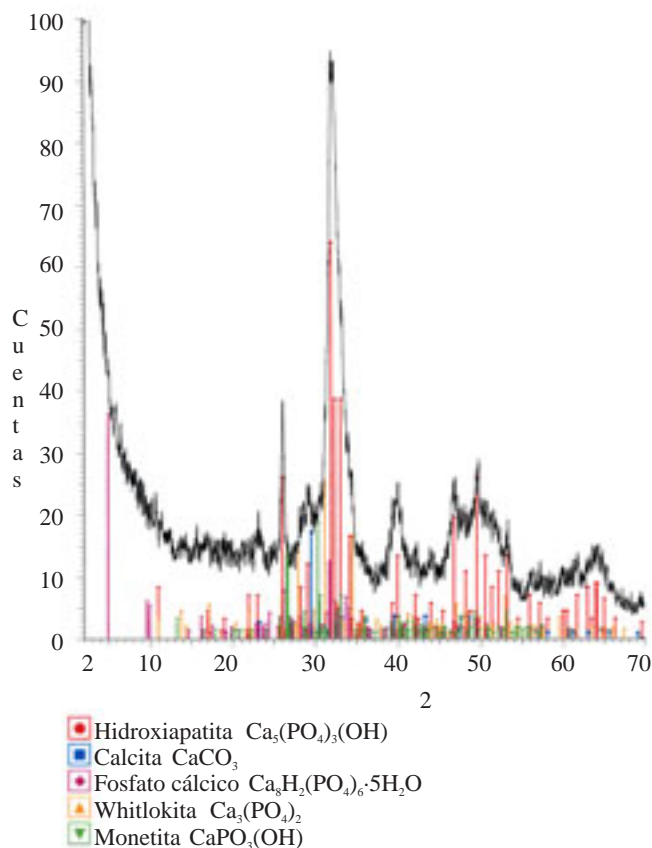
ND indica que no es detectable para concentraciones por debajo del límite de detección (LDD). Para Hg LDD = 0.001 mg/L.

3 ppm = 0.949 µg/g, 5 ppm = 1.582 µg/g y 30 ppm = 9.499 µg/g.

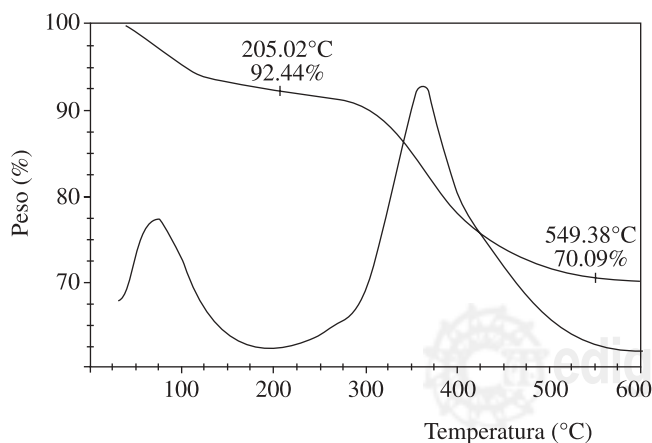
Nota: Los valores reportados son valores promedio obtenidos considerando tres muestras.

Cd, As y Hg están por debajo de los límites máximos de aceptación mientras que el Pb en promedio está muy cercano al límite de aceptación, hay que recordar

que el Pb existe en el ambiente y en la alimentación proporcionada a los animales, por lo que es importante que el bovino provenga de rastros de tipo inspección federal (TIF), los cuales garantizan la sanidad de los animales.



Gráfica 1. Patrón de difracción de rayos X de una muestra de hueso anorgánico "Nukbone", las líneas marcadas corresponden a HA, a carbonatos de Ca, y a fosfatos de calcio puros.



Gráfica 2. Espectros de ATG y ATD para hueso anorgánico "Nukbone", pueden verse dos caídas correspondientes a las pérdidas de agua y a material orgánico respectivamente.

La *gráfica 1* muestra el patrón de difracción de rayos X del material, así como los patrones de referencia especificados por la Norma. La posición e intensidad relativa de los picos marcados corresponden a HA, carbonatos de calcio y fosfatos de calcio puros. La matriz ósea tiene HA como componente principal, sin embargo presenta un componente amorfo ya que en el hueso existe HA estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) en poca cantidad siendo la HA deficiente en calcio ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$) la que se encuentra en mayor abundancia, además se encuentran otros elementos como magnesio (Mg), manganeso (Mn), fierro (Fe) e incluso plomo (Pb) en forma natural provenientes de la alimentación y del medio ambiente en general.

En la *gráfica 2* se muestran los espectros de ATG y ATD obtenidos para el hueso anorgánico. Se muestra claramente que hay una pérdida de masa de 50°C a 200°C de aproximadamente 10%; y corresponde a la de agua en el hueso. Otra pérdida importante, de aproximadamente 22% de la masa total corresponde a la materia orgánica que permanece en la muestra, se relaciona con la colágena contenida en el hueso y es la responsable de la estructura del mismo ya que sobre ella se depositan los cristales de HA formando la matriz ósea. Al aumentar la temperatura ésta se quema desbaratándose, quedando sólo polvo de HA y carbón.

El estudio de la microestructura se realizó para conocer el intervalo del tamaño de los poros del hueso anorgánico y saber si contaba con las características morfológicas necesarias para su vascularización, para que ocurra este proceso se requiere un tamaño de poro mayor a 150 μm .⁴ La *figura 2* muestra la estructura trabecular del material cuyo tamaño de poro va de 200 μm a 2 mm, lo que resulta ideal para su implantación.

La *gráfica 3* muestra el espectro de FTIR del hueso anorgánico y proporciona información sobre su estructura química, particularmente de los grupos funcionales presentes. La *tabla 2*, resume la información de las bandas observadas. Como era de esperarse, las bandas más intensas son las que se deben al agua molecular, a los aniones carbonato y a los grupos fosfato. Cabe mencionar que las bandas de carbonato en la región de 1,540 a 1,460 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de estiramiento asimétrico, ν_3 , del enlace C-O. El hecho de que aparezcan dos bandas y no una sola sugiere que el ión carbonato perdió simetría.

En cuanto a la esterilización, en ninguno de los medios de cultivo se proliferaron bacterias mostrándose la perfecta esterilización de las muestras.

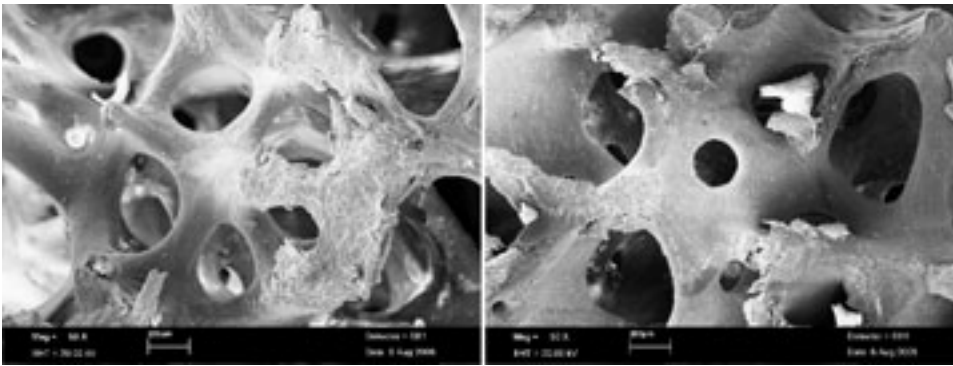
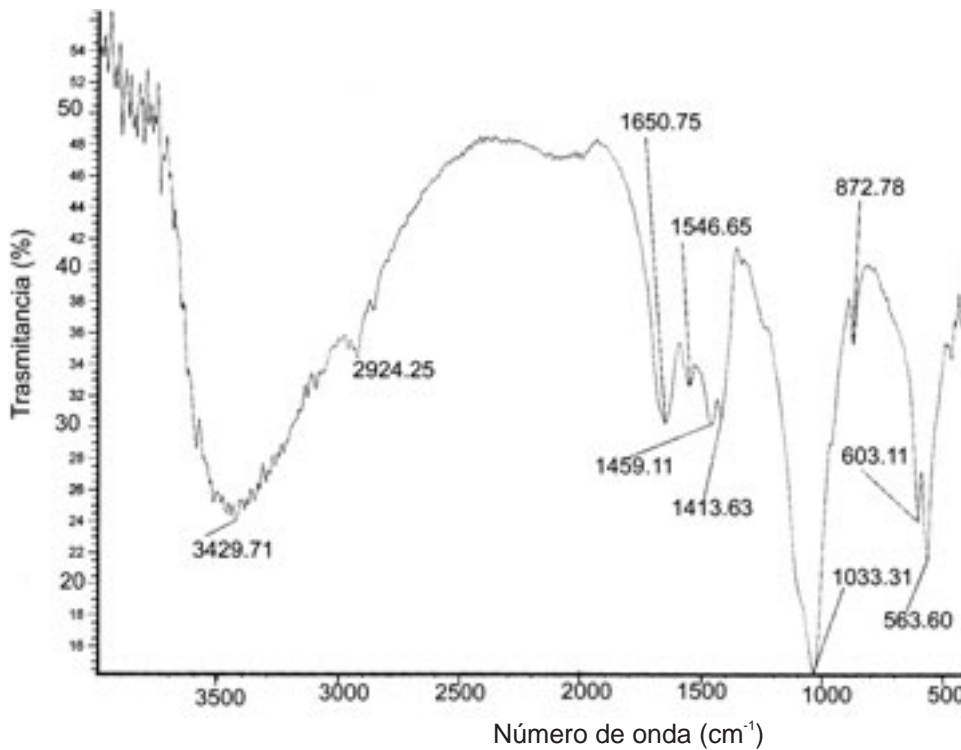


Figura 2. Microestructura del hueso anorgánico “Nukbone”. Puede observarse la estructura trabecular característica del hueso esponjoso, con poros interconectados de tamaños mayores a 150 µm.



Gráfica 3. Espectro FTIR de hueso de bovino anorgánico “Nukbone”.

Conclusiones

El hueso anorgánico denominado “Nukbone”, presenta valores de Ca, P, Ca/P, As, Cd, Hg, y Pb que permiten su uso como implante médico. Su componente principal es HA sin embargo tiene un componente de materia orgánica aproximadamente de 20% en peso correspondiente a la colágena que es la responsable de la estructura trabecular de la matriz ósea. El tamaño de los poros depende de la parte del cóndilo de la que proviene la muestra, siendo una gran parte de dicho hueso vascularizable por el tamaño de poros que presenta. Se puede esterilizar por completo garantizando así la seguridad de su empleo. El hueso anorgánico “Nukbone” cumple con las normas establecidas por la ASTM para su uso como xenoinplante.¹⁴⁻¹⁶

Tabla 2. Identificación de las bandas de infrarrojo.

Banda (cm ⁻¹)	Asignación Compuesto/enlace
3,429	H ₂ O/O-H
2,924	Proteína/C-H
1,650	H ₂ O/O-H
1,546, 1,459	CO ₃ ²⁻ /C-O
1,413	PO ₄ ²⁻ /P=O
1,080	CO ₃ ²⁻ /C-O
1,033	PO ₄ ²⁻ /P-O
872	CO ₃ ²⁻ /C-O
603	PO ₄ ²⁻ /O-P-O
563	CO ₃ ²⁻ /C-O

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Sansores C., director del IIM-UNAM, por su gran apoyo al Laboratorio de Biomateriales. AA Aguilar Santamaría, L Baños, C Vázquez, E Caballero, J Santoyo, LM García, C Ayala, por su ayuda técnica.

Este trabajo forma parte del proyecto IN101606 apoyado por la DGAPA-UNAM a quien agradecemos dicho apoyo.

Bibliografía

1. Rojas S, Domínguez VM. Alternativas para obtener un injerto óseo. *Acta Ort Mex*. 2002; 16(4): 225-30.
2. Brånemark R, Brånemark P-I, Rydevik B., Myers R: Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation. *J Rehabilitation Res and Develop*. 2001; 38(2): 175-81.
3. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present. *Future J of Postgraduate in Med (JPGM)*. 2002; 48(2): 142-48.
4. Karageorgiou V. Kaplan D: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005; 26 (27): 5474-91.
5. Annual Book of ASTM Standards, F 1581-99. Standard Specification for Composition of Anorganic Bone for Surgical Implants. USA: ASTM; 1999; 13.01. 893-95.
6. Le Geros RZ: Biological and Synthetic Apatites. In: P. Brown and Brent Constantz Ed. Hydroxyapatite and Related Compounds. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994: 3-28.
7. Walters Jr RL: The use of standard reference materials for quality assurance in inductively coupled plasma optical emission and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta B: At Spectros*. 1991; 46: 1593-1605.
8. Cullity BD: Elements of X-ray diffraction. Mass: Addison Wesley; 1978: 271-358 y 419-99.
9. Stewart JE: Infrared spectroscopy. Experimental methods and techniques. New York: Marcel Dekker Inc; 1970: 521-24.
10. Haines PJ: Thermal methods of analysis. Principles, applications and problems. Blackie Academic & Professional. London: Prentice Hall; 1995: 22-37.
11. Piña BMC, Palma CRB: Procedimiento para preparar implantes médicos de hidroxiapatita (HA) natural. UNAM, Solicitud de Patente Mexicana No. PA/a/2002/009719, 2002.
12. Goldstein JI, Romig Jr AD, Newbury DE, Lyman CE, Echlin P, Fiori C, Joy DC, Lifshin E: Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. A. text for biologists, materials scientists and geologists. 2nd ed. New York and London: Plenum press; 1994: 571-99.
13. Manual on radiation sterilization of medical and biological materials. Technical Reports Series No. 149. International Atomic Energy Agency. Vienna; 1973: 199-206 y 245-56.
14. Anderson IA, Mucalao MR, Johnson GS, Lorier MA: The processing and characterization of animal derived bone to yield materials with biomedical applications. Part III; Material and mechanical properties of fresh and processed bovine cancellous bone. *J Mater Sci: Mater Med*. 2000; 11: 743-49.
15. Tampieri, GC, Sprio S, Delcogliano A, Franzese S: Porosity graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials*. 2001; 22: 1365-70.
16. Tencer AF, Woodard PL, Swenson J, Brown KL: Mechanical and bone in growth properties of a polymer-coated, porous, synthetic, coralline hydroxyapatite bone graft material. *Annals NY Acad Sci*. 1988; 523: 157-72.

