

CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS PREPARADOS CON UN CO-MONÓMERO ALCALINO E HIDROXIAPATITA: ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Karen Lozano^{1*}, José Mina¹, Carlos Valencia², Mayra Valencia¹, Carlos Ospina³

1: Grupo Materiales Compuestos, Escuela de Ingeniería de Materiales, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, Cali (Colombia). 2: Grupo Biomateriales Dentales, Escuela de Odontología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali (Colombia). 3: Universidad del Valle, Cali (Colombia)

* e-mail: karen.lozano.nieva@correounivalle.edu.co



RESUMEN

A partir del análisis estadístico de los resultados de las pruebas mecánicas y de curado de formulaciones de cementos óseos adicionadas con Hidroxiapatita en porcentajes entre 0 – 20 p/p y Metacrilato de dimetil amino etilo (DMAEM) en porcentajes entre 0 – 10 p/p, reportadas en estudios previos [1], se seleccionaron cuatro formulaciones de cementos óseos con el fin de evaluar la formación de capas apatíticas sobre la superficie del material después de su inmersión en un fluido biológico simulado (FBS) durante 15 y 30 días. De igual manera, se estudió la reacción tisular mediante pruebas histológicas en tibias de conejos implantadas con los cementos. De acuerdo con el análisis por Microscopía Electrónica de Barrido y Espectroscopia de Energía Dispersiva (SEM – EDS), la presencia de la hidroxiapatita y el co-monómero favoreció la fijación de una capa similar a la apatita biológica en la superficie del material después de su inmersión durante 15 y 30 días en el FBS; mientras que, las formulaciones de cementos óseos sin modificar no evidenciaron la adhesión de la capa de apatita después del mismo tiempo de inmersión en el FBS. Por otra parte, las pruebas histológicas mostraron de manera cualitativa y cuantitativa que no se generó reacción inflamatoria en el tejido al estar en contacto con el cemento óseo con o sin modificación.

Palabras Claves: Cemento óseo, regeneración ósea, co-monómeros alcalinos, Hidroxiapatita, prueba *in vitro* e *in vivo*.

ACRYLIC BONE CEMENTS PREPARED WITH AN ALKALINE CO-MONOMER AND HYDROXYAPATITE: STUDIES *IN VITRO* AND *IN VIVO*

ABSTRACT

Based on the statistical analysis results of the mechanical and curing tests of bone cements formulations added with Hydroxyapatite in percentages between 0 – 20 w/w and Dimethyl amino ethyl methacrylate (DMAEM) in percentages between 0 - 10 w/w reported in previous studies [1], four bone cements formulations were selected to evaluate the fixation of an apatite layer on its surface after immersion in a simulated biological fluid (FBS) for 15 and 30 days, and the tissue reaction through histological tests in rabbits tibias implanted with the material. According to the analysis by Scanning Electron Microscopy and Dispersive Energy Spectroscopy (SEM - EDS), the presence of hydroxyapatite and the co-monomer favored the fixation of a layer similar to biological apatite on the surface of the material after immersion for 15 and 30 days in the FBS; whereas, the formulations of unmodified bone cements showed no adhesion of the apatite layer after the same time of the immersion in the FBS. In general, the histological tests showed qualitatively and quantitatively that there was no inflammation reaction in the tissue when in contact with the modified or unmodified bone cement.

Keywords: Bone cement, bone regeneration, alkaline co-monomers, Hydroxyapatite, *in vitro* and *in vivo* tests.

1. INTRODUCCIÓN

El cemento óseo acrílico es un compuesto no bioactivo y altamente hidrofóbico debido a la naturaleza del monómero (metil metacrilato). Lo anterior genera que al ser implantado, este sea encapsulado mediante la formación de un tejido fibroso como respuesta de las células encargadas de la regeneración ósea [2, 3]. Los cementos óseos acrílicos también presentan reacciones de polimerización altamente exotérmicas, monómero residual, contracción después del curado, propiedades mecánicas inadecuadas, y aflojamiento a largo plazo de la prótesis como consecuencia de la falta de fijación secundaria entre el cemento y el hueso [4, 5].

Con el fin de contrarrestar estas desventajas y promover la bioactividad, nuevas formulaciones de cementos óseos acrílicos con componentes que difieren ligera o notablemente de las formulaciones comerciales, han sido desarrolladas. Tal como la incorporación de partículas biocerámicas en la matriz de PMMA, que han mostrado un rendimiento óptimo en cuanto a propiedades mecánicas y tribológicas, con la capacidad de iniciar reparación de tejido óseo, al igual que los nanomateriales de carbono, bisfosfonatos y algunas proteínas; también, se ha indicado que la incorporación de algunos co-monómeros, activadores de baja toxicidad y/o polímeros biodegradables ayudan a disminuir la temperatura máxima de polimerización, además de generar superficies con zonas hidrófilas que permiten el reemplazo de hueso nuevo [6]-[12]. No obstante, estos materiales deberán proporcionar inicialmente la resistencia mecánica necesaria a la zona reconstruida y permitir o inducir la regeneración ósea, permitiendo de esta manera el proceso usual de remodelación para optimizar las propiedades mecánicas del hueso neoformado, convirtiéndolo en una estructura de soporte mecánicamente competente [13].

De acuerdo a lo anterior, en la presente investigación se estudió una alternativa que permite aumentar la bioactividad y mejorar la biocompatibilidad del cemento, promoviendo el crecimiento de tejido óseo sobre la superficie del material con la incorporación de Hidroxiapatita (HA), puesto que se ha logrado evidenciar en distintos modelos animales la formación de un enlace directo entre el implante y el tejido óseo, confirmándose el carácter bioactivo de estas

cerámicas [14]-[17]. Adicionalmente, se logró modificar la naturaleza de la carga superficial del cemento con la incorporación de un co-monómero con grupos amino (DMAEM), puesto que las células generadoras de hueso (osteoblastos) se depositan y proliferan mejor en superficies parcialmente hidrofílicas cargadas positivamente, como las generadas por la protonación de los grupos amino del co-monómero [18]-[20].

Hasta el momento es escasa la bibliografía asociada al estudio del comportamiento in vivo e in vitro de cementos óseos modificados con un fosfato de calcio y un co-monómero alcalino [21], enfocándose los estudios principalmente en la evaluación fisicoquímica, térmica y mecánica del material. En este sentido, se espera que los resultados obtenidos asociados al efecto mixto de la Hidroxiapatita y el DMAEM contribuyan a un mejor entendimiento del comportamiento biológico de la interface Hueso-Cemento, y que algunas de las formulaciones de cementos desarrolladas sean susceptibles de ser utilizadas en implantes de regeneración ósea tanto en ortopedia como en odontología.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reactivos

La fase sólida de los cementos estuvo compuesta por perlas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) con tamaño de partícula promedio de 63,6 μm adquiridas en Veracril® (New Stetic), peróxido de benzoilo (BPO) con 25 % de humedad y 97 % de pureza, marca Alfa Aesar® como iniciador de la reacción de polimerización por radicales libres del monómero, sulfato de bario (BaSO_4) marca Alfa Aesar® para facilitar el seguimiento radiográfico de los cementos durante y después de la implantación, e Hidroxiapatita comercial grado reactivo de referencia sigma-aldrich® que presentó un diámetro medio de partícula de 25,82 μm y una distribución de tamaño entre 14,77 μm y 44,32 μm . La fase líquida se preparó con metil metacrilato (MMA) y metacrilato del 2(dimetilamino etilo) (DMAEM) adquiridos en Merck®, además contiene una amina aromática, N, N – dimetil- p-toluidina (DMPT) que actúa como activador para que la iniciación de la reacción de polimerización se dé a temperaturas y tiempos acordes a los requerimientos clínicos. Tanto los componentes de la fase sólida, como los de la fase líquida se usaron tal como se recibieron del

proveedor, sin ninguna purificación previa.

2.2 Diseño experimental

Basado en el análisis estadístico arrojado por el software Minitab 16® para los resultados de la caracterización mecánica, térmica y de curado de los cementos óseos acrílicos modificados con HA y DMAEM reportados por Lozano et al. [1] y con el fin de evaluar la influencia de la HA y del DMAEM en los cementos óseos bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*, se definió estudiar las formulaciones que se presentan en la Tabla 1. Para fines comparativos se utiliza como referencia una muestra patrón que corresponde al cemento sin carga y sin comonomero.

Tabla 1. Formulaciones seleccionadas para la preparación de cementos óseos modificados con HA y/o DMAEM.

Formulación	Composición (% p/p)						
	Fase líquida			Fase sólida			
	DMAEM	MMA	DMPT	BaSO ₄	PMMA	BPO	HA
Patrón	0	97,5	2,5	10	88	2	0
1	5	92,5	2,5	8,9	78,6	2	10,5
2	0	97,5	2,5	8,9	78,6	2	10,5
3	5	92,5	2,5	10	88	2	0

2.3 Preparación de los cementos óseos

De acuerdo con las proporciones de cada uno de los componentes, establecidas en la Tabla 1, se prepararon los cementos óseos acrílicos. Primero se dosificaron los componentes líquidos (MMA + comonomero + DMPT) y sólidos (PMMA + BPO + BaSO₄ + carga) en recipientes separados, y luego se mezclaron manualmente ambas fases a temperatura ambiente, manteniendo siempre una relación sólido/líquido de 2. Una vez el líquido entra en contacto con el sólido se inicia la reacción de polimerización por radicales libres del MMA que conlleva al endurecimiento del cemento.

2.3.1 Curado de los cementos óseos

Al entrar en contacto el peróxido presente en la fase sólida y la amina presente en la fase líquida tiene lugar la reacción redox que da lugar a la generación de los radicales libres. (Figura 1(a)). Los primeros radicales libres generados son consumidos por los inhibidores, y una vez consumidos los inhibidores, estos se unen a los monómeros insaturados, formando centros activos (figura 1b). Esta unión del monómero con el radical libre da lugar a una especie reactiva que es capaz de unirse a otro monómero dando lugar a la cadena polimérica creciente (figura 1c). La reacción de terminación ocurre cuando se dejan de producir radicales libres y, en el caso del PMMA se da principalmente por la unión entre cadenas activas [22].

2.4 Prueba In Vitro

Para estudiar la interacción del cemento óseo con el medio fisiológico, se sumergieron 6 probetas de cada una de las cuatro formulaciones estudiadas, en un Fluido Biológico Simulado (FBS) y se extrajeron 3 muestras en cada período de ensayo (15 y 30 días). Las probetas consistieron en cilindros de 6 mm de diámetro y 12 mm de altura, a los cuales se les calculó el área superficial para determinar el volumen del FBS a emplear, mediante el modelo presentado en la Ecuación 1. El FBS fue preparado según la formulación planteada por Miyazaki et al. [23] y posee una composición iónica similar a la del plasma sanguíneo humano. Este se preparó disolviendo en agua Tipo I (libre de contaminantes disueltos o iónicos coloidales y orgánicos) [24] cada uno de los reactivos especificados en la formulación, manteniendo agitación constante y teniendo en cuenta que cada reactivo fue añadido después de la completa disolución del anterior. Una vez calculado el volumen adecuado de la solución del FBS, éste se colocó en un recipiente de plástico y el espécimen se sumergió completamente en la solución a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Transcurridos 15 y 30 días, respectivamente, se retiraron las probetas de la solución, se lavaron con agua destilada y se secaron moderadamente con aire caliente.

$$V_s = S_a/10 \quad (1)$$

Donde V_s es el volumen de FBS (ml) y S_a es la superficie aparente de la muestra (mm^2).

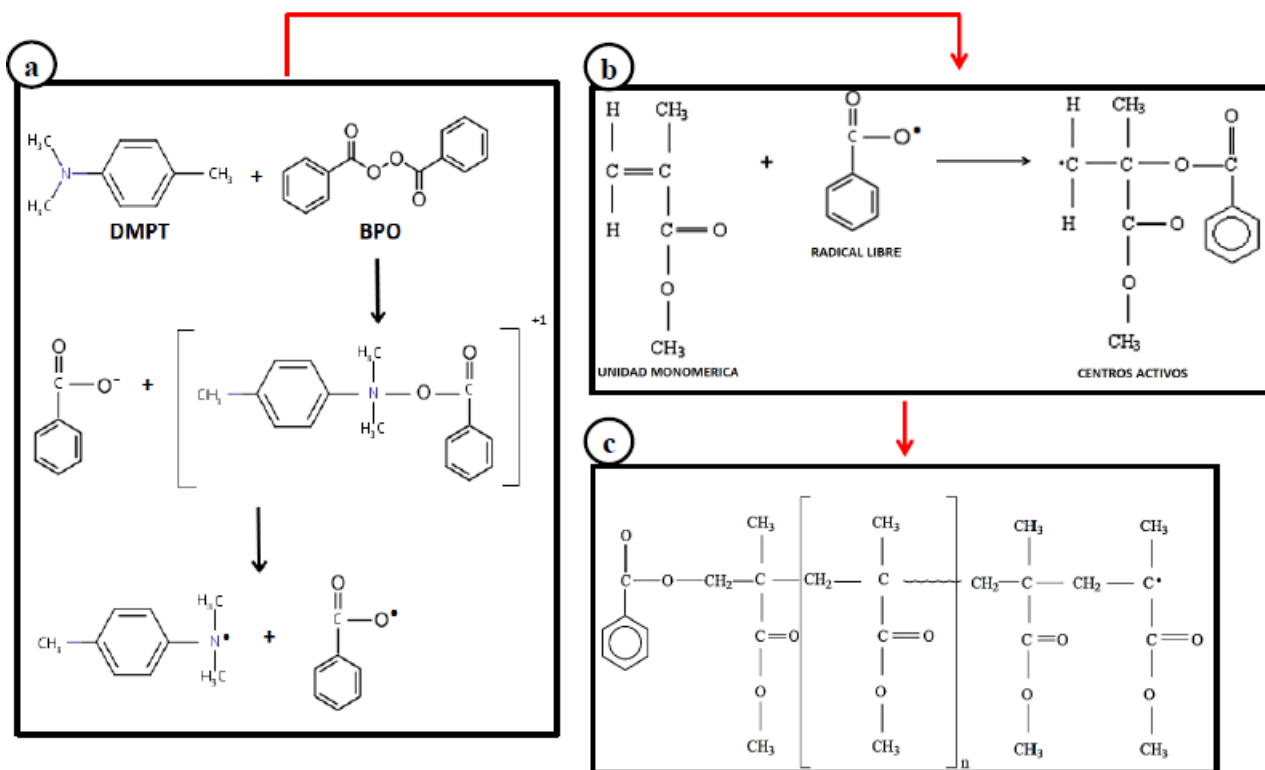


Figura 1. Polimerización vía radicales libres del PMMA de los cementos óseos: (a) Formación radicales libres, (b) Reacción de iniciación, (c) Reacción de propagación.

Se empleó un Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL SEM modelo JSM – 6490LV con imágenes de electrones secundarios para observar la formación del crecimiento de capas apatíticas en la superficie, posterior a la inmersión en el fluido biológico simulado. El equipo SEM se acopló a un sistema de micro-análisis químico por espectroscopia de energía dispersiva (EDS) para el análisis cualitativo y semicuantitativo de la composición química de las muestras. Las muestras fueron montadas en porta muestras de aluminio y pegadas con cinta de carbono, posteriormente se recubrieron con una película de oro, por un tiempo de aproximadamente dos minutos, mediante la técnica de espolvoreado catódico.

2.5 Prueba *In Vivo*: Estudio de reacción tisular por medio de pruebas histológicas en tibias de conejos.

La prueba de reacción tisular fue de tipo

experimental. Como biomodelos se utilizaron conejos, machos, de raza *New Zealand*, de 3 meses de edad y un peso entre 2600 – 3800 gramos. El criterio para determinar el número de sujetos se basó en la norma ISO 10993-6, el cual arrojó un total de 20 conejos (5 por cada formulación) [25].

Previamente el componente líquido se filtró por membranas en una cabina de flujo laminar y el componente sólido se sometió a proceso de esterilización con óxido de etileno; luego se mezclaron ambas fases y posteriormente el cemento óseo fue implantado en tibias de conejo en un defecto de 2,5 mm de diámetro. Después de 28 días de implantado el material, se realizaron eutanasias y se enviaron los especímenes a patología con instrucción de realizar tres cortes longitudinales (cresta, medio y medular) y reportar el tipo y contenido de células encontradas.

Los protocolos asociados con la adecuación del bioterio, selección de los animales, así como el manejo y ética de la investigación, fueron aprobados

por el Comité de Ética Animal de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle mediante el Acta No. 001 de 2010.

Siguiendo la norma ISO 10993-6:2016 [25], se determinó el número de animales (cinco para cada formulación). Se evaluaron las condiciones de salud de los animales, mediante toma de registros de temperatura corporal, peso, consumo de alimentos; y se realizaron observaciones acerca del comportamiento del animal, tales como: acicalamiento, mantenimiento del hábitat, transporte de materiales, posiciones en reposo y alerta. Al llegar al bioterio todos los animales fueron vacunados con 0,2 miligramos de Ivermectina al 1%, subcutáneo.

Esta prueba se realizó en varias fases:

2.4.1. Primera fase (etapa quirúrgica).

Se preparó un defecto óseo circular de 2,5 mm en la tibia derecha de cada biomodelo, utilizando fresas de titanio para hueso de diámetro secuencial iniciando con la de 1,8 mm.

Para el procedimiento quirúrgico se siguió el protocolo utilizado en la Fundación CIEO (Centro de Investigación en Estudios Odontológicos). Así como los instructivos establecidos para la fase quirúrgica de enjertación de hueso y/o substitutos óseos, de la siguiente forma [26]:

- Anestesia y sedación

A cada biomodelo se le suministró vía parenteral 0,3 mg por kilogramo de Tranquilán (Maleato de Acepromicina) y 0,4 mg por kilogramo de Xilasyn (Oxilacina al 2%).

- Preparación del campo quirúrgico

Se realizó tricotomía del área a operar, técnica de asepsia y antisepsia en la zona con Isodine en espuma, colocación de campo quirúrgico, Aplicación Lidocaína al 2% con Epinefrina 1:80,000, técnica infiltrativa para anestesia local para vasoconstricción.

- Procedimiento quirúrgico

Se elaboró la incisión y la disección para preparar un defecto óseo circular, en el cual posteriormente se implantó el cemento óseo. Luego, se realizó confrontación de tejidos y cierre, y finalmente se

aplicaron fármacos post-quirúrgicos (analgésico y antibiótico) y se protegió el área con antibiótico tópico localmente.

- Eutanasia

Después de 28 días de la implantación del material, se efectuó la eutanasia mediante aplicación intravenosa de una dosis de 5 ml de pentobarbital sodico en la vena marginal de la oreja; el procedimiento fue realizado siguiendo recomendaciones internacionales y bajo la supervisión directa de un médico veterinario, quien se encargó del desarrollo del aspecto ético.

2.4.2. Segunda fase.

Se recuperaron las muestras del tejido óseo injertado con los diferentes cementos, se decalcificaron los tejidos con solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% en búfer fosfato (PBS) por 2 meses, se retiraron las partículas de cemento óseo, se realizó la preparación de la muestra mediante deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina; se realizaron tres cortes a cada espécimen, uno a nivel crestal, otro a nivel medio, y el tercero en proximidad al canal medular; y se estudió el tipo de células y cantidades presentes en porcentaje por campo.

2.4.3. Tercera fase.

Con los informes de la histología se realizó un análisis estadístico descriptivo basado en los valores promedios de los resultados relacionados con las células encontradas en el material.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Prueba in vitro por inmersión en fluido biológico simulado.

A pesar de los cuestionamientos ya reportados en algunas investigaciones respecto a la "capacidad de formación de apatita" sobre la superficie de un material al ser sumergido en un FBS [27], es apropiado examinar la posible formación de éstos precipitados sobre los compuestos de cemento óseo a base de PMMA modificados con mineral bioactivo, antes de la experimentación con biomodelos, puesto que el número y la duración de los experimentos pueden reducirse notablemente con la aplicación preliminar de esta caracterización.

Los posibles mecanismos de formación de apatita sobre la superficie de las formulaciones de cemento óseo, PMMA-HA y PMMA-DMAEM-HA, se presentan de manera esquemática en la Figura 2. En principio el material presenta una carga superficial negativa, conferida por los iones fosfato (PO_3^{-4}) e hidroxilo (OH^-) de la HA presente en el cemento (Figura 2(a)); lo anterior permite que después de la inmersión en el FBS se dé la interacción superficial con los iones calcio (Ca^{2+}) de la solución, formando

una capa inicial de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) amorfo “rico en calcio” con una carga superficial positiva (Figura 2(b)). Posteriormente, esta capa interactúa con los iones PO_3^{-4} de la solución, precipitando dichos iones sobre la superficie del cemento y transformando el recubrimiento anterior en una capa de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ amorfo “pobre en calcio” (Figura 2(c)), la cual cristaliza finalmente en una capa de apatita neoformada cuyos principales componentes químicos son calcio y fósforo (Figura 2(d)) [28] [29].

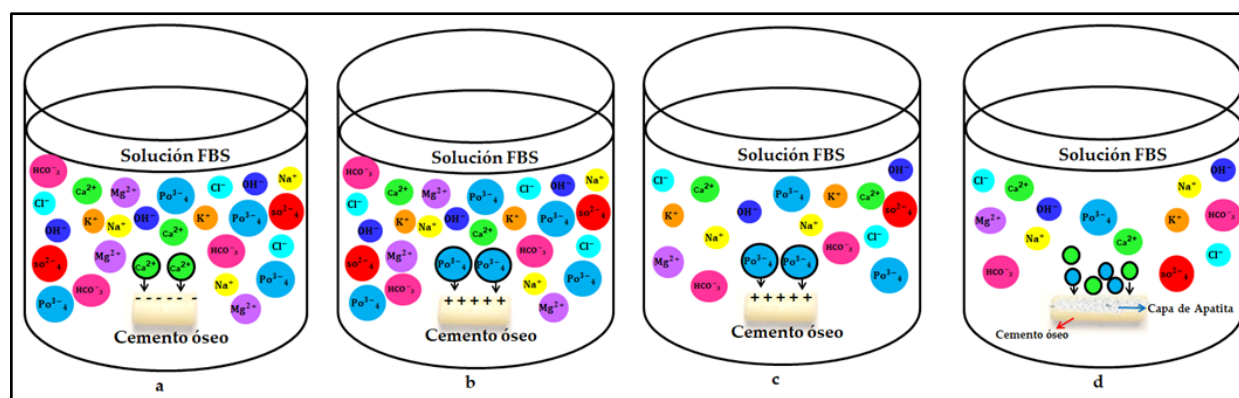


Figura 2. Mecanismos de formación de apatita: (a) cemento con carga negativa, (b) cemento con capa de fosfato de calcio amorfo rico en calcio, (c) cemento con capa de fosfato de calcio amorfo pobre en calcio, (d) cemento con capa de apatita neoformada.

En la Figura 3, se muestra la imagen SEM de la superficie del cemento óseo sin cargas bioactivas (muestra patrón), inmerso durante 3 semanas en el fluido biológico simulado. Se pueden observar las perlas de PMMA (zona A) sin disolver, rodeadas de una matriz de monómero polimerizado (zona B). Poco se sabe acerca de las características de inclusión de las perlas de polímero dentro de la matriz de monómero, Sin embargo, algunas investigaciones mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) demuestran que el proceso de incorporación es muy sensible a las condiciones químicas y ambientales durante el mezclado [30]. Las imágenes obtenidas en la presente investigación son comparables con muestras de cementos óseos recuperados en cirugías de revisión [31], donde es evidenciado que efectivamente existe una interfaz entre las perlas de polímero y el monómero

polimerizado. De igual manera, en este trabajo plantean que el proceso de incorporación resulta a menudo incompleto y las perlas de polímero se liberan y/o aflojan desde la matriz de monómero que las rodea; afectando a su vez la resistencia a la tensión como consecuencia de la pérdida de adherencia interfacial entre dichas perlas y la matriz [31].

Por otro lado, con los resultados del micro-análisis hecho por Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS), para determinar la composición química de la muestra patrón (Tabla 2), No se identificó la presencia de P o Ca, lo que sin lugar a duda demuestra que el cemento óseo acrílico es un polímero no bioactivo, su matriz polimérica (MMA polimerizado) es altamente hidrofóbica por lo que debilita el contacto carga – solución y se dificulta el crecimiento de apatita sobre su superficie.

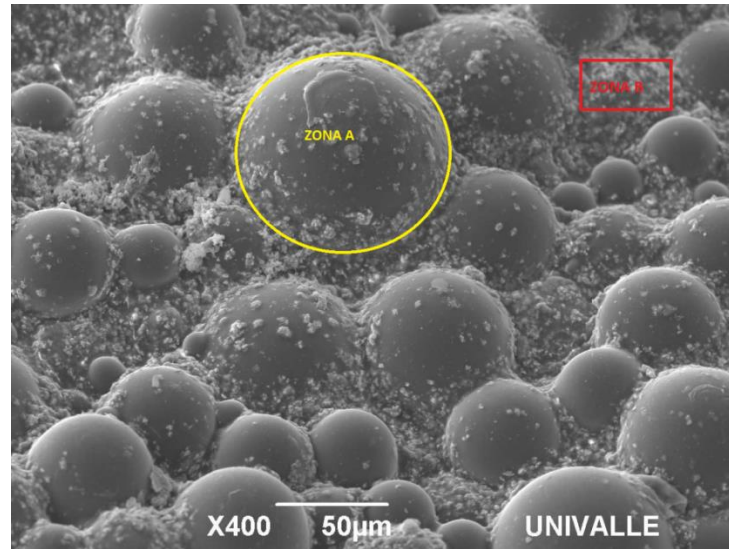


Figura 3. Imagen SEM a 800X del cemento óseo acrílico patrón (0% HA – 0% DMAEM).

Tabla 2. Análisis EDS de formulaciones de cementos óseos modificadas con DMAEM y/o HA (1, 2, 3) y sin modificar (patrón), después de 15 y 30 días de inmersión en un FBS.

formulación	C (%atom)	O (%atom)	S (%atom)	Ba (%atom)	P (%atom)	Ca (%atom)	Ca/P	Na (%atom)	K (%atom)	Cl (%atom)
Patrón (15 días)	75,2	21,91	1,04	0,85	-	-	-	-	-	-
Patrón (30 días)	76,83	22,44	0,3	0,43	-	-	-	-	-	-
1 (15 días)	50,79	41,57		0,23	2,46	3,79	1,54	0,7	0,11	0,35
1 (30 días)	65,43	23,39	0,74	1,27	3,25	5,09	1,57	-	-	0,83
2 (15 días)	41,4	40,61	-	-	8,86	9,13	1,03	-	-	-
2 (30 días)	63,46	16,63	-	1,38	6,4	12,13	1,90	-	-	-
3 (15 días)	46,82	49,05	-	0,16	0,16	-	-	3,43	0,38	-
3 (30 días)	62,61	31,19	0,74	0,47	0,78	1,16	1,49	2,53	0,2	0,32

Ha sido reportado que la incorporación de comonómeros con grupos amino a formulaciones de cemento óseo, conduce a una mejora en la biocompatibilidad del material debido a que las células generadoras de hueso (osteoblastos) se depositan y proliferan mejor en superficies parcialmente hidrófilas cargadas positivamente, como las generadas por la protonación de los grupos

amino del comonómero [18]-[20]. Lo cual se corrobora en el presente estudio a partir de los resultados obtenidos después de la inmersión de la muestra que contenía 5 % p/p de DMAEM (formulación 3), en un fluido biológico simulado durante cuatro semanas. En las Figuras 4(a) y 4(b) se muestra la imagen SEM de este material transcurridos 15 y 30 días de inmersión,

respectivamente. En estas se identifican pequeños precipitados, depositados desde las primeras semanas, lo que demuestra que es factible que el comonomero empleado aumente la bioactividad del cemento óseo. El análisis por EDS sintetizado en la Tabla 2 arrojó bajos porcentajes de fósforo en la superficie del cemento óseo durante las primeras semanas (0,16 % átomos), lo que puede ser atribuido a que en un principio la amina terciaria es insoluble en agua; pero la presencia de un ácido diluido en el FBS (disolución acuosa) hace que la misma forme sales de amonio y aumente su solubilidad. Lo anterior da como resultado la protonación de la amina y la atracción de iones PO_4^{3-} hacia la superficie del cemento aumentando la cantidad de fósforo depositada sobre la superficie a 0,78 % átomos y alcanzándose una relación entre iones Ca y P de 1,49.

En la Figura 4(c) y 4(d), se muestran las imágenes SEM de las superficies del cemento óseo de la formulación 2, que contenía 10,5 % de HA, en estas se observa la presencia de pequeños núcleos dispersos tanto en la matriz de monómero polimerizado como en las perlas del polímero, con tamaño y forma irregular que se han formado después de 15 días de inmersión en FBS (Figura 4(c)), los cuales después de 30 días de inmersión muestran un aumento en cantidad que los lleva a unirse entre si formando estructuras de precipitados que cubren casi en su totalidad las perlas de PMMA y la matriz de monómero. Con el análisis EDS se logró identificar la presencia de calcio y fósforo respectivamente en proporciones de 9,13 % átomos y 8,86 % átomos, a los 15 días y de 12,13 % átomos y 6,36 % átomos a los 30 días, de estar sumergidas las muestras (Tabla 2).

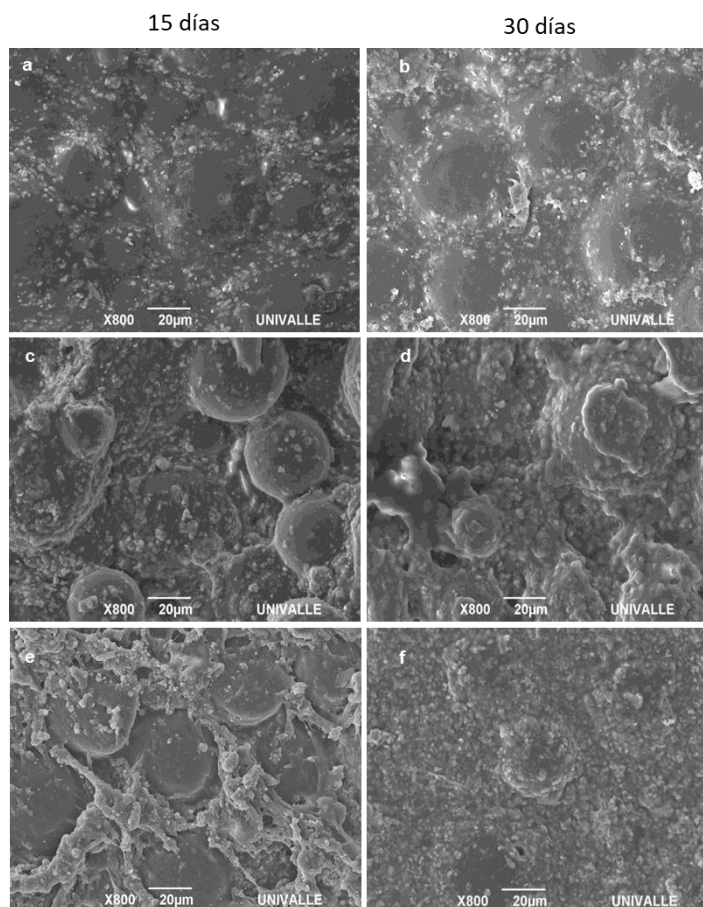


Figura 4. Imagen SEM a 800X de: a) y b) formulación 3 de cemento (5% DMAEM); c) y d) formulación 2 de cemento (10,5% HA); e) y f) formulación 1 de cemento (5% DMAEM y 10,5% HA). a), c) y e) corresponden a muestras después de 15 días de inmersión y b), d) y f) corresponden a muestras después de 30 días de inmersión.

En las Figura 4(e) y 4(f), se presentan las imágenes SEM de la superficie de las muestras de cemento óseo con 10,5 y 5 % p/p de HA y DMAEM, respectivamente, después de estar inmersas por 15 y 30 días en el FBS. La Figura 4(e) evidencia que después de 15 días de inmersión hay una leve aparición de aglomerados de partículas con apariencia densa, producto de la formación de nuevas estructuras sobre las partículas iniciales, algunas zonas de estas capas densas conservan una morfología porosa, la cual tiende a desaparecer con el tiempo de inmersión. También se aprecia la presencia de partículas de apariencia esférica formando pequeños cúmulos débilmente condensados; esta nueva capa es atribuida a la formación de apatita, semejante a la apatita biológica, formada por el material bioactivo al estar en contacto con el FBS. Por otra parte, después de 30 días de inmersión (Figura 4(f)) la apariencia de la apatita neoformada está mejor distribuida sobre la superficie del material, generándose capas ligeramente más densas y conservando una apariencia porosa. La evidencia de la apatita neoformada está en la variación de la relación de los iones Ca y P de la capa generada en la superficie del cemento reportada en la tabla 2, con respecto a la relación de la apatita estequiométrica incorporada en las diferentes formulaciones de cemento que corresponde a 1.67 [32].

Es importante resaltar que se observa desde los primeros días de inmersión en el FBS la formación de fosfato de calcio amorfo rico en calcio, siendo esta afirmación sustentada en el resultado del

microanálisis por EDS que se llevó a cabo en diferentes regiones asociadas a la superficie del cemento óseo (Tabla 2). En este sentido, se logró comprobar que la capa depositada estaba constituida por 3,79 % átomos de Ca y 2,46 % átomos de P, para los primeros 15 días de acondicionamiento. Por otro lado, como era de esperarse, al aumentar el tiempo de inmersión los consumos de calcio y fósforo de la capa depositada a partir de la solución fueron mayores, lo que se logra apreciar en el EDS después de haber estado las muestras 30 días en el FBS, (5,09 y 3,25 % átomos Ca y P, respectivamente). Con base a lo anterior, se puede afirmar que el tratamiento estudiado mostró tener potencialidad para la formación de una capa de apatita sobre la superficie del cemento al ponerse en contacto con un FBS.

3.2 Prueba in vivo: Estudio de reacción tisular por medio de pruebas histológicas en tibias de conejos.

En el análisis microscópico se logró identificar los diferentes tipos de células presentes en los alrededores de la interfaz hueso-cemento, después de transcurridos 28 días de haberse implantado el material en las tibias de los conejos, éstas fueron: células óseas (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos), así como estructuras biológicas importantes para la regeneración ósea como los vasos sanguíneos y la médula ósea (roja o amarilla) [33]. En la Tabla 3 se resumen los resultados.

Tabla 3. Porcentajes de células, vasos sanguíneos y médula ósea encontrados en las histologías de las tibias de los conejos, que contenían cemento óseo acrílico. Los porcentajes reportados corresponden a los promedios de los tipos celulares de interés (Ob, OC, Oc), obtenidos en 10 campos de microscopio óptico diferentes, observados aleatoriamente.

Células	Patrón	Formulación 1	Formulación 3
Osteoblastos (Ob)	24%	17%	25%
Osteoclastos (OC)	3%	13%	10%
Osteocitos (Oc)	73%	70%	65%
Vasos sanguíneos	40%	40%	40%
Inflamatorias	Negativo	Negativo	Negativo
	Amarilla	Amarilla	Rojas
Médula ósea	Roja	Roja	Arteriolas
	Arteriolas	Arteriolas	Adipocito

Los valores de osteoblastos en las muestras control y con DMAEM son muy similares, sin embargo en la muestra con DMAEM e hidroxiapatita se observa una disminución importante en esta población, pero a la vez un aumento en el número de osteocitos, lo que podría estar indicando un proceso más rápido de diferenciación celular y por ende de neoformación ósea, lo que también se observa en el aumento de osteoclastos, las células encargadas del recambio óseo en el remodelado de la matriz ósea formada inicialmente.

La diferencia entre medula roja y amarilla es debida a la presencia de vasos sanguíneos en este tejido, en general se considera que la roja es joven o recién formada y tiene muchos vasos sanguíneos y menos células grasas (adipocitos), mientras que la amarilla es una medula más madura, más vieja y tiene menos vasos sanguíneos y más células grasas.

Es de esperarse que el procedimiento quirúrgico que se realizó para llegar al canal haya ocasionado un estrés quirúrgico que estimuló la formación de medula nueva [34]; en general después del procedimiento quirúrgico se encuentra la presencia de medula roja (tejido neoformado), responsable a su vez de la formación de nuevas líneas celulares tanto óseas como hematopoyéticas, pero también se debe encontrar medula amarilla (tejido preexistente); una vez superada la etapa aguda la medula roja se transformara progresivamente en medula amarilla. En la tabla 3, Se puede observar que hubo presencia de los dos tipos, solo que en la muestra de cemento sin modificar y en la muestra con DMAEM e hidroxiapatita predominó la medula amarilla mientras que en la muestra con solo DMAEM predominó la roja.

Los resultados mostrados en la tabla 3 corresponden al día 28 después de la implantación, para este momento ya se superó la etapa de inflamación aguda, situación que se confirma por la ausencia de células inflamatorias; la presencia de osteoblastos y osteoclastos indican que la lesión quirúrgica que se creó todavía está en proceso de reparación lo que explica la presencia tan alta de vasos sanguíneos (40 % en todas las muestras), ya que estos son necesarios para garantizar el proceso debido a su papel en el transporte de células, nutrientes y oxígeno.

De igual manera, vale la pena resaltar que la ausencia de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos) y la presencia de células responsables de la reparación y remodelado óseo como osteoblastos, osteocitos, y osteoclastos indican la biocompatibilidad del material implantado. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se puede inferir que el cemento óseo no produjo una respuesta citotóxica ya que se encuentra rodeado de hueso neoformado y células óseas.

3.2.1 Formulación Patrón

En la Figura 5, se aprecian dos cortes histológicos que muestran el proceso de neoformación ósea de una cavidad a la cual se le implantó la formulación patrón. En la figura 5(a), se observa el canal medular (1) rodeado por hueso cicatrizal periférico (2) y conteniendo la medula ósea (3). Además, se pueden identificar algunas células óseas, posiblemente osteoblastos (4) rodeando el canal medular; identificado con el número 5 se encuentra la zona de la preparación (zona del defecto óseo), donde se implantó el material; en el canal medular también se identifica medula ósea amarilla (6) y algunos vasos sanguíneos, marcados con estrellas.

En la figura 5(b) el corte corresponde al hueso cicatrizal correspondiente a la zona donde se realizó la preparación para implantar el material, se aprecia cicatrización completa del defecto y se diferencian dos zonas, una marcada con el número 8 correspondiente a una zona más antigua y otra marcada con el número 7 que parece corresponder a un tejido en proceso de remodelado.

3.2.2 Formulación 1 (5 % DMAEM – 10,5 % HA)

En la Figura 6, se aprecia el corte histológico que muestra el proceso de neoformación ósea de una cavidad a la cual se le implantó cemento óseo acrílico modificado con carga bioactiva y comonomero alcalin.

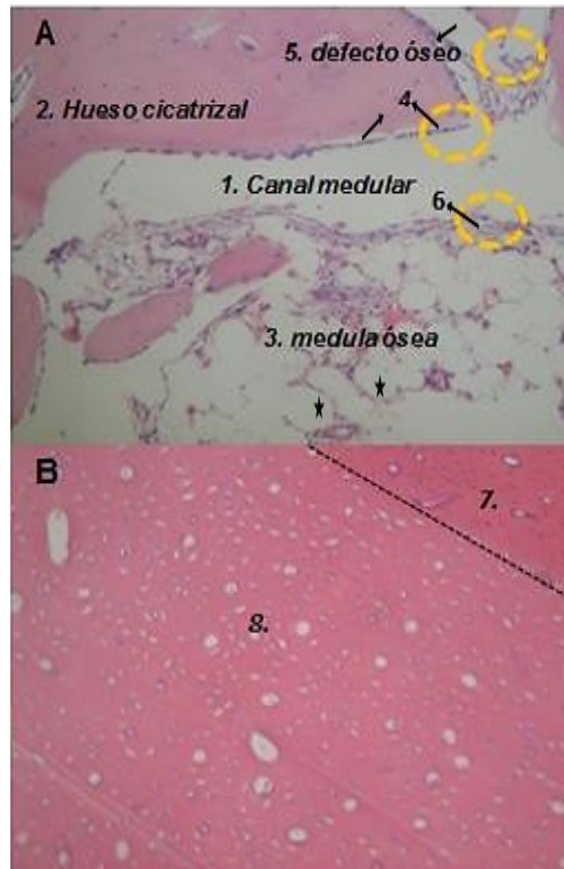


Figura 5. Histología de la interfaz hueso-cemento óseo acrílico sin carga y sin comonomero (0% DMAEM-0% HA). Que muestra el corte del espécimen en la proximidad con el canal medular (A) y a nivel medio (B).

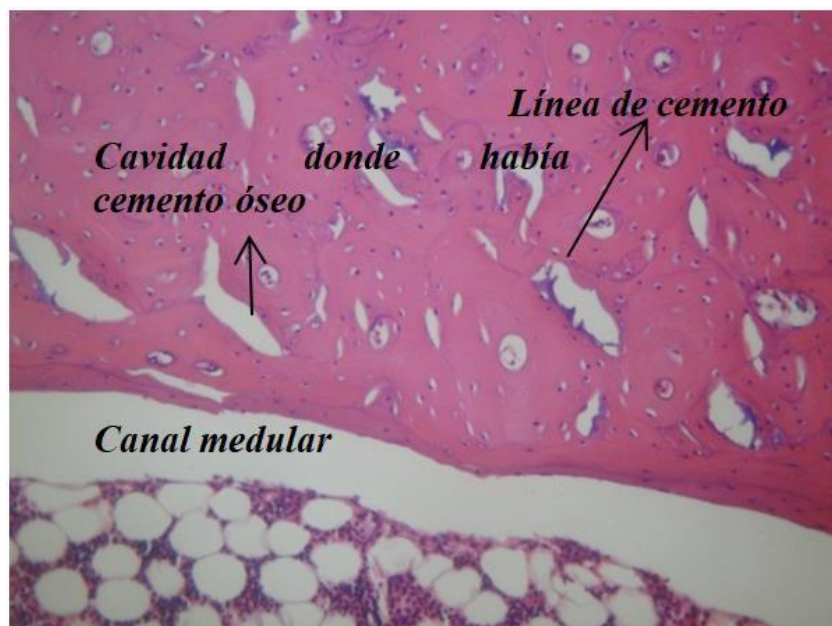


Figura 6. Histología de la interfaz hueso-cemento óseo acrílico modificado con 10,5% de HA y 5% DMAEM.

El porcentaje de medula ósea roja del defecto óseo fue alto (70 %), lo cual es bueno puesto que el aumento del porcentaje de medula roja ayuda a incrementar la cantidad de células óseas (Osteoblastos y Osteocitos). En la proximidad con el canal medular se identificaron líneas de cemento que tienen la función de separar las diferentes etapas de formación de tejido óseo.

El porcentaje de osteocitos, es mayor para esta formulación que contiene HA que para la que contiene solo comonomero, lo cual unido a la observación de un número menor de osteoblastos (17% vs 25%), podrían estar indicando un proceso de remodelado más rápido para las muestras a las que se les incorporó tanto DMAEM como HA.

Con los resultados anteriores y en vista de que no se encontraron células inflamatorias en la interfaz hueso-cemento se puede inferir que el cemento óseo modificado con HA y DMAEM no afectó la cicatrización normal del hueso. Además, la masiva presencia de osteocitos en su cavidad osteocitaria y de líneas de cemento, dan a entender que el proceso de cicatrización del cemento pudo haber ocurrido más rápido en comparación con los casos anteriores.

3.2.3 Formulación 3 (5 % DMAEM)

En la Figura 7, se muestra el proceso de

regeneración ósea de una cavidad en la cual se implantó cemento óseo acrílico con 5 % de DMAEM. En esta imagen se observa que la interfaz donde se ubicó el cemento óseo (1) se rodeó completamente de células óseas (osteoblastos y/o osteoclastos); además, ocurrió el proceso de cicatrización normal del hueso, diferenciándose al igual que en el caso de la formulación patrón, el hueso periférico del viejo.

La cantidad de osteoblastos en la periferia de la muestra con DMAEM fue un poco superior a la de la muestra control, lo que está de acuerdo con los reportes acerca de que la protonación del grupo amina en el co-monómero promueve una mayor adhesión y proliferación de las células formadoras de hueso [18]-[20]. La razón por la que el aumento en la cantidad de osteoblastos es tan baja, se puede atribuir a que los osteoblastos son células transitorias cuyo valor debe estar elevado en los momentos iniciales de la cicatrización pero disminuye a medida que el proceso regenerativo madura debido a su diferenciación terminal a osteocitos. En la formulación no se encontraron células inflamatorias, razón por la cual se puede deducir que el cemento óseo acrílico con comonomero alcalino es biocompatible al ser implantado en tejidos óseos.

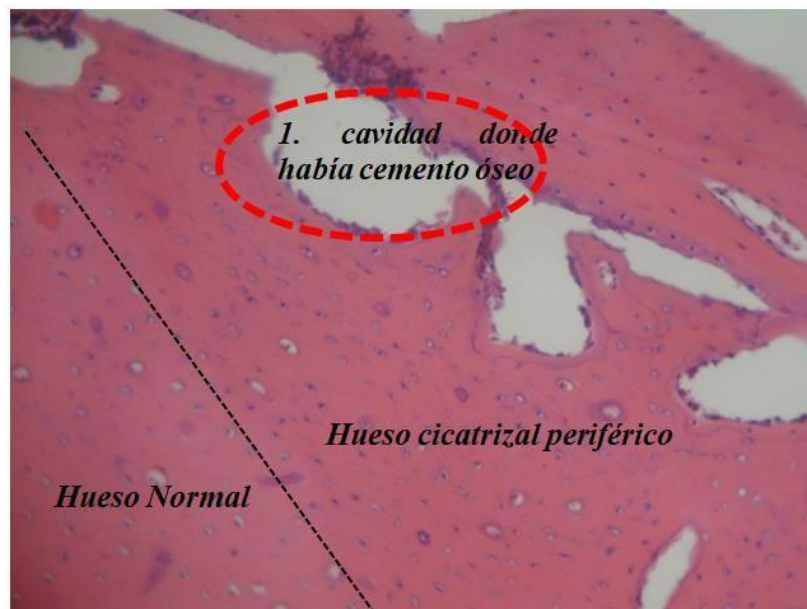


Figura 7. Histología de la interfaz hueso-cemento óseo acrílico modificada con 5% de DMAEM y sin Hidroxiapatita.

Finalmente, a los 28 días la presencia de osteoclastos en las tres formulaciones (3 %, 13 %, y 10 %) es normal porque se está dando la remodelación después del proceso inicial de cicatrización ósea, y la proporción con relación al número de osteoblastos y osteocitos es adecuada porque indica que hay más aposición que resorción.

La presencia de osteoclastos es mayor en las 2 formulaciones modificadas que en la patrón, lo cual sumado a valores adecuados para osteoblastos (17 y 25 %) podrían estar indicando un mayor estímulo a la neoformación ósea. Se observa también una presencia de osteoclastos ligeramente mayor en la formulación de cemento 1 lo cual se explica por ser estas las células las encargadas de digerir las partículas fosfocálcicas [35].

En general para las tres formulaciones estudiadas el porcentaje de osteoblastos es inferior al de osteocitos puesto que el proceso de cicatrización y formación de hueso iniciales ya ha pasado; lo normal es que en este periodo halla un porcentaje alto de osteocitos porque son células maduras derivadas de osteoblastos que quedan atrapados en sus lagunas dentro de la matriz ósea calcificada.

4. CONCLUSIONES

Las formulaciones modificadas en la fase líquida o sólida, mostraron propiedades bioactivas en condiciones *in vitro* e *in vivo* a diferencia de la formulación sin modificación (patrón), en la cual no se evidenció presencia de formación de capa apatítica sobre su superficie en condiciones *in vitro*, y se presentó una menor actividad de las células formadoras de hueso (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos).

Los resultados en condiciones *in vitro*, muestran que la adición de DMAEM aumentó en menor grado la bioactividad de los cementos óseos en comparación con la adición de HA.

Los resultados *in vivo* demuestran que el cemento óseo modificado con 5 % de DMAEM en la fase líquida y 10,5 % de HA en la fase sólida presenta mayor bioactividad comparada con las otras formulaciones, ya que acelera el proceso de cicatrización del defecto óseo generado en la tibia de los biomodelos.

Por su buen comportamiento bioactivo tanto *in vitro*

como *in vivo*, las formulaciones estudiadas en este trabajo son susceptibles de ser empleadas en la fijación de prótesis ortopédicas y/o dentales.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias, Al Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda y a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle, en el marco de la Convocatoria 566- 2012, banco para formación de alto nivel para la ciencia, la tecnología y la innovación. Por el apoyo otorgado durante el proceso de selección, vinculación y desarrollo del proyecto de investigación: “Preparación y Caracterización de Cementos óseos acrílicos bioactivos para usar en Prótesis.

6. REFERENCIAS

- [1]. Lozano K, Mina J, Zuluaga F, Valencia C, Valencia M, “Influencia de la incorporación de un co-monomero alcalino e hidroxiapatita en las propiedades de cementos óseos acrílicos,” DYNA. 2013; 80 (181): 153–162.
- [2]. Draenert K, Draenert Y, “The Three Interfaces,” in *The Well-Cemented Total Hip Arthroplasty Theory and Practice*, S. J. Breusch and H. Malchau, Eds. Berlin, Germany: Springer Medizin Verlag, 2005, 93–102.
- [3]. Frankenburg, Hoffler, Shibuya, Saito, Lavagnino, Nolan, y otros. (1998). “Evaluation of hydroxyapatite/BISGMA bone cement for fixation of cemented hip stems”. 3rd combined meeting of the Orthopaedic Research Societies of the USA, Canada, Europe and Japan.
- [4]. Lewis G, “Properties of acrylic bone cement: state of the art review”, *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 38 (2): 155–182.
- [5]. Asgharzadeh H, Ayatollahi M, Naimi M, “Influence of Hydroxyapatite Nano-particles on the Mechanical and Tribological Properties of Orthopedic Cement-Based Nano-composites Measured by Nano-indentation and Nano-scratch Experiments” *Journal of Materials Engineering and Performance*. 2015; 24(9): 3306.
- [6]. Pilliar R, Blackwell R, Macnab I, Cameron H, “Carbon fiber-reinforced bone cement in

- orthopedic surgery,” *J. Biomed. Mater. Res.* 1976; 10 (6): 893–906.
- [7]. Song D, Xin-Zhan M, Mu-liang D, Jiang-Dong N “Effects of Alendronate Sodium Content on the Interface Strengths of Composite Acrylic Bone Cement” *International Journal of Endocrinology.* 2015; ID 502820.
- [8]. Li T, Weng X, Bian Y, Zhou L, Cui F, Qiu Z “Influence of Nano-HA Coated Bone Collagen to Acrylic (Polymethylmethacrylate) Bone Cement on Mechanical Properties and Bioactivity,” *PLOS ONE journal.* 2015; 10(6): 1-17
- [9]. Slane J, Vivanco J, Rose W, Ploeg H, Squire M “Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver Nanoparticles,” *Materials Science and Engineering .* 2015; 48: 188–196.
- [10]. Gilbert J, Ney D, Lautenschlager E, “Self-reinforced composite poly(methyl methacrylate): Static and fatigue properties,” *Biomaterials.* 1995; 16 (14): 1043–1055.
- [11]. Artola A, Gurruchaga M, Vázquez B, San Román J, Goñi I, “Elimination of barium sulphate from acrylic bone cements. Use of two iodine-containing monomers,” *Biomaterials.* 2003; 24 (22): 4071–4080.
- [12]. Vázquez B, Deb S, Bonfield W, Román J, “Characterization of new acrylic bone cements prepared with oleic acid derivatives,” *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 63 (2): 88–97.
- [13]. Feith R, “Side-effects of acrylic cement implanted into bone: a histological,(micro) angiographic, fluorescence-microscopic and autoradiographic study in the rabbit femur,” *Acta Orthop. Scand.* 1975; 46(161): 1–136.
- [14]. López M, González R, “Cementos óseos acrílicos modificados con hidroxipatita,” *CENIC Ciencias Biológicas.* 2006; 37(2): 77–87.
- [15]. Dalby M, Di Silvio L, Harper E, Bonfield W, “In vitro evaluation of a new polymethylmethacrylate cement reinforced with hydroxyapatite,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999; 10 (12): 793–796.
- [16]. Harper J, Behiri C, Bonfield W. Flexural and fatigue properties of a bone cement based upon polymethylmethacrylate and hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.: Mater.Med.* 1995; 6, 799.
- [17]. Serbetci K, Orhun S, Korkusuz F, Hasirci N. (2002). In Vivo Biocompatibility of Hydroxyapatite Containing Bone Cement. *Arthroplasty Arthroscopic Surgery.* 13., 259.
- [18]. Cervantes-Uc J, Vázquez-Torres H, Cauch-Rodríguez J, Vázquez-Lasa B, Del Barrio J, “Comparative study on the properties of acrylic bone cements prepared with either aliphatic or aromatic functionalized methacrylates.,” *Biomaterials.* 2005;19: 4063–72.
- [19]. Elliott J, Hamerton I, Hay J, Shaw S, “Synthesis and characterisation of novel methyl methacrylate-2-(dimethylamino)ethyl methacrylate copolymer salts containing polymerisable anions,”. 2003; *Polymer* 44: 3775–3784.
- [20]. May-Pat A, Cervantes-Uc J, Flores-Gallardo S, “propiedades mecánicas de cementos óseos acrílicos preparados con co-monómeros con grupos amino”. *IBEROMET XI,* 2010
- [21]. Islas-Blancas M, Cervantes J, Vargas-Coronado R, Cauch-Rodríguez J, Vera-Graziano R, Martínez-Richa A, “Characterization of bone cements prepared with functionalized methacrylates and hydroxyapatite,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001; 12 (8): 893–910.
- [22]. M. E. Valencia Zapata, “Caracterización reológica de cementos óseos acrílicos para vertebroplastia y/o cifoplastia preparados con monómeros Alcalinos,” Trabajo de grado de Maestría, Escuela de Ingeniería de Materiales, Universidad del Valle, 2009.
- [23]. Miyazaki T, Kim H, Kokubo T, Ohtsuki C, Nakamura T, “Apatite-Forming Ability of Niobium Oxide Gels in a Simulated Body Fluid.,” *J. Ceram. Soc. Japan.* 2001; 109 (11): 929–933.
- [24]. ASTM D1193-06, Standard Specification for Reagent Water, (2018).
- [25]. International Organization for Standardization, “ISO 10993-6:2016: Biological evaluation of medical devices -- Part 6: Tests for local effects after implantation,” 2016.
- [26]. Valencia C, Pastrana E, Arroyabe E, Morales C, “Determinación del tiempo de reabsorción de una matriz de ácido poliláctico utilizada como sustituto óseo en cavidades preparadas en tibias de conejos”. (Parte II) *Revista ODONTOS. Fundación CIEO.* 2009; 31: 30-34
- [27]. Shoujie L, Hejun L, Leilei Z, Xuemin Y, Yao Guo, “in simulated body fluid performance of polymorphic apatite coatings synthesized by pulsed electrodeposition,” *Materials Science and Engineering C* 79 (2017) 100–107
- [28]. Pahlevanzadeh F, Bakhsheshi-Rad H, Hamzah E, “In-vitro biocompatibility, bioactivity, and mechanical strength of PMMA-PCL polymer containing fluorapatite and graphene oxide bone cements,” *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 82 (2018) 257–267
- [29]. Kima H, Himenob T, Kokuboc T, Nakamurad T,

- “Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid”, *Biomaterials* 26 (2005) 4366–4373.
- [30]. Draenert K, Draenert Y, Garde U, Ulrich C, *Manual of Cementing Technique*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1999.
- [31]. López C, Manchola J, Medina S, Moreno S, *Reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño secundaria a biomateriales y su respuesta inmunológica: Revisión sistemática de la literatura*. *Salutem Scientia Spiritus*. 2016, 2(1):21-28.
- [32]. J. Latocha, M. Wojasiński, K. Jurczak, S. Gierlotka, P. Sobieszuk, and T. Ciach, “Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles in 3D-printed reactors,” *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 133, no. July, pp. 221–233, 2018.
- [33]. Espinosa O, Arce-Paredes P, *Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Primera parte*. *Bioquímica*. 2003; 28 (4): 19-30.
- [34]. Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm B, Hoffmann C, Rasic A, Sader R, Unger R, Peters F, and Kirkpatrick C, “Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo,” *Acta Biomater*. 2010; 6 (12): 4476–4487.
- [35]. Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust J, “The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone,” *J. Biomed. Mater. Res*. 2002; 63 (4): 408–412.