

NUEVOS BIOMATERIALES Y MÉTODOS PARA EL DEFECTO DE HUESO CRANEOFACIAL: INJERTOS DE HUESO CONDROIDE EN HENDIDURAS ALVEOLOMAXILARES

*EFRAIN SUELDO R; DO, DM **EIMY OMORI M.; CD

El interés es reportar el trabajo de investigación efectuado por los investigadores del Departamento de Ortodoncia de la Escuela Dental de la Universidad de Hiroshima doctores: Toshisugu Kawabata, Shinya Kohno, Tadashi Fujita, Hiroki Sugiyama, Chiyoko Tokimasa, Masato Kaku y Kazuo Tanne; para conocimiento en idioma español de estos nuevos biomateriales y los métodos por ellos utilizados nos ha impedido a efectuar su difusión en nuestro medio para despertar el interés en nuestros investigadores y poder efectuar trabajos similares que son de interés universal en esta era de la globalización del conocimiento del siglo XXI.

RESUMEN

El propósito de este estudio fue evaluar médula autógena osteogénica dentro de injertos de hueso condroide en defectos alveolares simulados en ratones y determinar la capacidad del material de injerto para cerrar eficazmente la hendidura desde un punto y observar el efecto del procedimiento de injerto. Fueron hechos defectos de tamaño crítico en los huesos premaxilares de ratones machos utilizando un trépano quirúrgico y una máquina dental debaja velocidad como un modelo de la hendidura alveolo maxilar para probar los agentes osteoinductores. Los defectos premaxilares no fueron reparados por tejido fibroso o formación ósea 30 días después de la operación. Esta falta de cicatrización ósea de la premaxila en el ratón puede ser útil como un modelo para estudiar el efecto de los agentes osteoinductores en la cicatrización de hendiduras alveolares. La distracción osteogénica es un recientemente avanzado principio de alargamiento óseo por el cual un hueso largo separado por osteotomía es expuesto a lenta y progresiva distracción utilizando un recurso de fijación externa. El lugar de la osteotomía fue rodeado por callo, consistente de cartílago hialino. El callo contuvo abundante hueso condroide. El hueso trasplantado dentro de hueso condroide fue caracterizado por formación de hueso y remodelamiento 30 días después del trasplante. A lo largo del experimento, nuestros hallazgos demostraron, por primera vez, que el óseo que contiene hueso condroide puede ser utilizado clínicamente en relación a los defectos de hueso craneofacial para mejorar el tratamiento de injertos óseos.

Palabras claves: Injerto óseo - injerto de hueso condroide - hendidura alveolo maxilar - osteogénesis por distracción.

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate autogenous osteogenic marrow within chondroid bone grafts in simulated alveolar defects of mice in order to determine the ability of the graft material effectively close the cleft from an osseous standpoint and to observe the effect of the grafting procedure. Critical-sized defects were made in the premaxillary bones of male mice using a surgical trephine and a low - speed dental engine as a model of the maxillary alveolar cleft for testing bone - inductive agents. Premaxillary trephine defects were not repaired by fibrous tissue or bone formation 30 days after operation.

This nonhealing bony wound of the premaxilla in mice may be useful as a model for studying the effect of bone-inductive agents on the healing of alveolar cleft. Distraction osteogenesis is a recently advanced principle of bone lengthening in which a long bone separated by osteotomy is subjected to slow progressive distraction using an external fixation device. The osteotomy site was surrounded by an external callus consisting of hyaline cartilage. The callus contained a lot of chondroid bone. The transplant bone within chondroid bone was characterized by bone formation and remodeling 30 days after transplantation. Throughout the experiment, our finding demonstrated, for the first time, that the transplant bone that contains chondroid bone may be used clinically in relation to craniofacial bone defects to improve the treatment of bone grafts.

Key words: bone graft - chondroid bone graft - maxillary alveolar cleft - distracción osteogenesis.

* Pas Director del Instituto de Investigación Estomatológica UNMSM.
Director del Centro de Periodoncia e Implantología Lima-Perú.
** Cirujano Asistente del Centro de Periodoncia e Implantología.

INTRODUCCIÓN

La regeneración de hueso en defectos óseos resultados de las hendiduras alveolomaxilar es de una importancia superior en la restauración de pérdida de forma y función. En la actualidad, el más confiable material regenerativo de hueso para defectos de hendidura alveolomaxilar y hendidura de paladar es hueso autólogo haversiano fresco de costilla, cresta iliaca o parte anterior de la tibia (Ames *et al.*, 1981. Marx *et al.*, 1984). El material de trasplante es perdido por remodelamiento del hueso en un tiempo comparativamente temprano.

Nosotros estuvimos buscando un material de trasplante para el nuevo hueso en las hendiduras de paladar. Existe un considerable interés en el desarrollo de las alternativas al autoinjerto de hueso fresco. En años recientes, diversos laboratorios hubieron reportado el aislamiento de factores de la matriz de hueso desmineralizado que pudo inducir la formación ósea, tal como proteína morfogenética ósea (Urist *et al.*, 1984), osteogenina (Luyten *et al.*, 1989), y factor osteoinductivo (Bentz *et al.*, 1989). Además, genes de moléculas osteoinductores, BMP-1, BMP-2^a, BMP-2B, y BMP-3, han sido clonadas (Wozney *et al.*, 1988). Posteriormente, Yasui *et al.* (1977) y Sato *et al.* (1998) reportaron un tercer mecanismo de osificación, "formación de hueso transcondroide". El hueso condroide, un tejido intermedio entre hueso y cartílago, fue formado directamente por condrocitos como células, con la transición de tejido fibroso a hueso ocurriendo gradualmente y consecutivamente sin invasión capilar. El propósito de este estudio fue para evaluar la médula autógena osteogénica dentro de injertos de hueso condroidal en defectos alveolares simulados de ratones en orden para determinar la capacidad del material de injerto para cerrar eficazmente la hendidura desde un punto fijo y para observar el efecto del procedimiento de injerto.

MATERIALES Y MÉTODOS

C57BL ratones macho y hembra fueron importados desde Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Los ratones fueron dejados en cajas de metal (22 x 32 x 11 cm) con viruta de madera autoclavada para condicionar el cuarto del animal (temperatura de 24 ± 2°C; humedad relativa, 50 ± 5%). Este estudio fue aprobado por la Comunidad de Uso del Animal de la Universidad de Hiroshima, y los animales fueron mantenidos en concordancia con los reglamentos para el cuidado y uso de animales de laboratorio en la Universidad de Hiroshima.

Los ratones fueron divididos en 3 grupos: Injertos de hueso condroidal (n=3); sin hendidura (n=3); y no operados (n=3). Los ratones operados fueron anestesiados, vía inyección intraperitoneal de

pentobarbital sódico (0.06 mg/g de peso corporal). Una pequeña incisión fue entonces realizada en la mucosa del hueso premaxilar bajo condiciones estériles y los tejidos blandos fueron elevados. Un defecto óseo de 1,2 mm de diámetro, libre de periostio, fue preparado en el medio de cada premaxila posterior al incisivo superior; esto fue realizado con un trépano conducido por una máquina dental de baja velocidad, de acuerdo al método diseñado por Takano-Yamamoto *et al.* (1993).

Bajo anestesia general con Pentobarbital Sódico, una incisión latero longitudinal en la piel fue realizada en la tibia. La piel fue cortada longitudinalmente y cuidadosamente retraída. La corteza del hueso fue perforada utilizando un taladro de 0,5-1,0 y dos tornillos autorroscantes de 0,7-1,2 mm en diámetro fueron posicionados en los ángulos derechos al axis del eje de la tibia. Se realizó una osteotomía entre los tornillos utilizando el manual visto. Los tornillos fueron entonces empalmados al recurso de fijación externa de manera que la terminación de los dos huesos fue reducida. El periostio fue suturado para cubrir el sitio de la osteotomía. Un pequeño fijador monolateral externo (Tornillo de expansión: Sankin Co., Osaka, Japón) fue fijado al aspecto anterolateral de la tibia izquierda con dos pines.

Se inició la distracción 10 días después de la osteotomía en una proporción de 0,25mm cada 24 horas, y fue detenida 18 días después de la osteotomía (8 días de distracción). El proceso de formación de hueso nuevo fue seguida por controles semanales radiográficos (RM-60: Asahi Roentgen, Kyoto, Japan). Las radiografías fueron tomadas después de la osteotomía con voltajes acelerados de 20 kV y exposiciones de 3 segundos.

El hueso trasplantado contenido dentro del hueso condroidal fue removido y limpiado de tejido suave adherente 18 días después de la osteotomía. Un particular injerto de médula ósea, hueso esponjoso, y hueso condroide fue removido del calo de la tibia distractada. En el grupo de injertados, el defecto fue llenado hasta el nivel de la otra tabla de hueso premaxilar con 5 mg del hueso trasplantado de dentro del hueso condroide.

Estos grupos experimentales fueron concluidos en 30 días después del injerto de hueso o sin él. Se mataron a los ratones no operados a las 16 semanas de vida. Se removieron los maxilares superiores, se fijaron en 4% de formaldehído por 12 horas a 4°C, descalcificados en 5% de ácido tetraacético etilendiamina (EDTA: pH 7,4) por 1 semana, embebidos en parafina, y cortados frontalmente en secciones de 7 µm de grosor. Estas secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina (HE) y con tartreterresistant acid phosphatase (TRAP), que generalmente es conocido como un marcador citoquímico de osteoclastos, y finalmente contrateñido con hematoxilina.

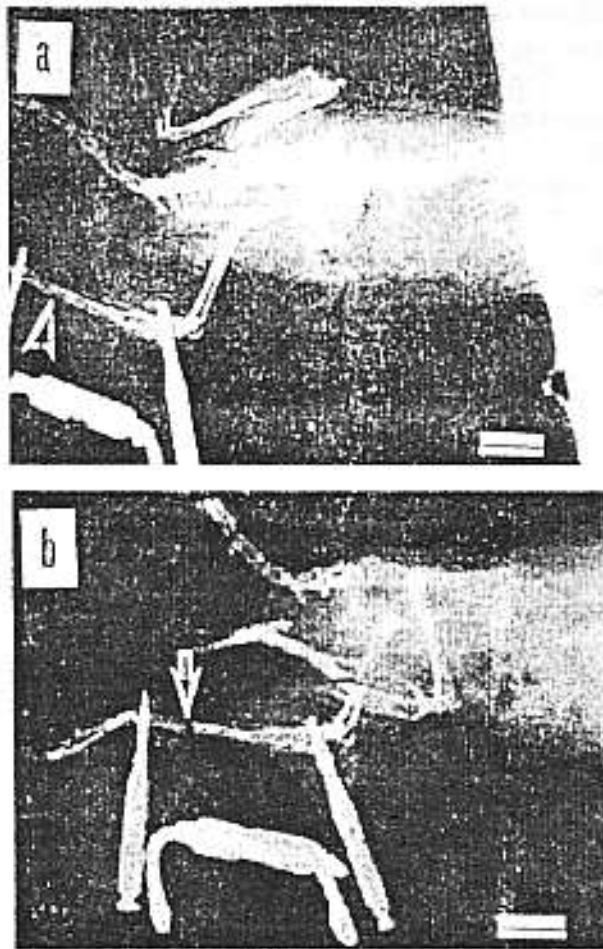


Fig. 1
A: Radiografía de la tibia 10 días después de la osteotomía, justo antes de iniciar la distracción. La punta de la flecha indica la fractura lineal. B: Radiografía del alargamiento de la tibia de 2mm durante 8 días de distracción. Barra horizontal = 1cm.



Fig. 2
Sección longitudinal fotomicrográfica de un injerto óseo de un grupo de 3 animales, 25 días después de la osteotomía. La tibia fue alargada por 2mm durante 8 días de distracción. La parte de la caja fue trasplantada a la hendidura del hueso alveolar. bm, médula ósea; c, corteza; ce, callo endosteico; ft, tejidos fibrosos; nb, hueso nuevo. (Tintura de HE, barra horizontal = 500 µm)

Resultados

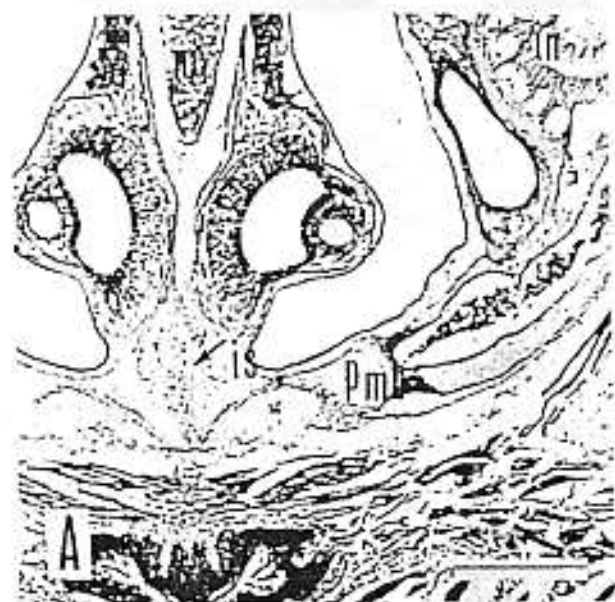
Hallazgos Radiográficos

Fig. 1^a, b muestra los cambios radiográficos durante la distracción. Durante el período de espera, el sitio de osteotomía se rodea por una nube de callo inmaduro (Fig. 1^a). Luego de finalizada la distracción, el puente de callo separado entre los segmentos proximal y distal.

Hallazgos Histológicos

Fig. 2 muestra secciones longitudinales de la tibia extendida en 2 mm y teñida con HE. El callo externo originante del periostio desprendido expandido alrededor de las diáfisis proximal y distal, por cuanto el callo endósteo fue limitado a la entrada de la cavidad de la médula ósea en la tibia. El área central del callo fue fijada con tejidos elongados, tejido fibroso y cartilago. La parte de la caja fue trasplantada a las hendiduras de hueso alveolar.

La apariencia histológica de 16 semanas de vida del ratón es mostrada en la Fig. 3. El ratón no operado tuvo una estructura típica de la sutura incisiva compuesta de zonas claras de multiplicación de células (Fig. 3A). Los defectos trephine premaxilares en el grupo de no injertados no fueron reparados por tejido fibroso o formación de hueso. Una pequeña cantidad de células gigantes multinucleadas, células inflamatorias mononucleares, y macrófagos fueron vistas dentro del tejido blando cercano al margen de la fractura ósea (Fig. 3B). El injerto óseo con el trasplante de hueso del hueso condroide fue caracterizado por formación de puentes y remodelamiento. Sin embargo, no fueron vistos condrocitos 30 días después del injerto de hueso (Fig. 3C). TRAP-positivo de células no fueron descubiertas en la formación del puente óseo (No se muestran datos).



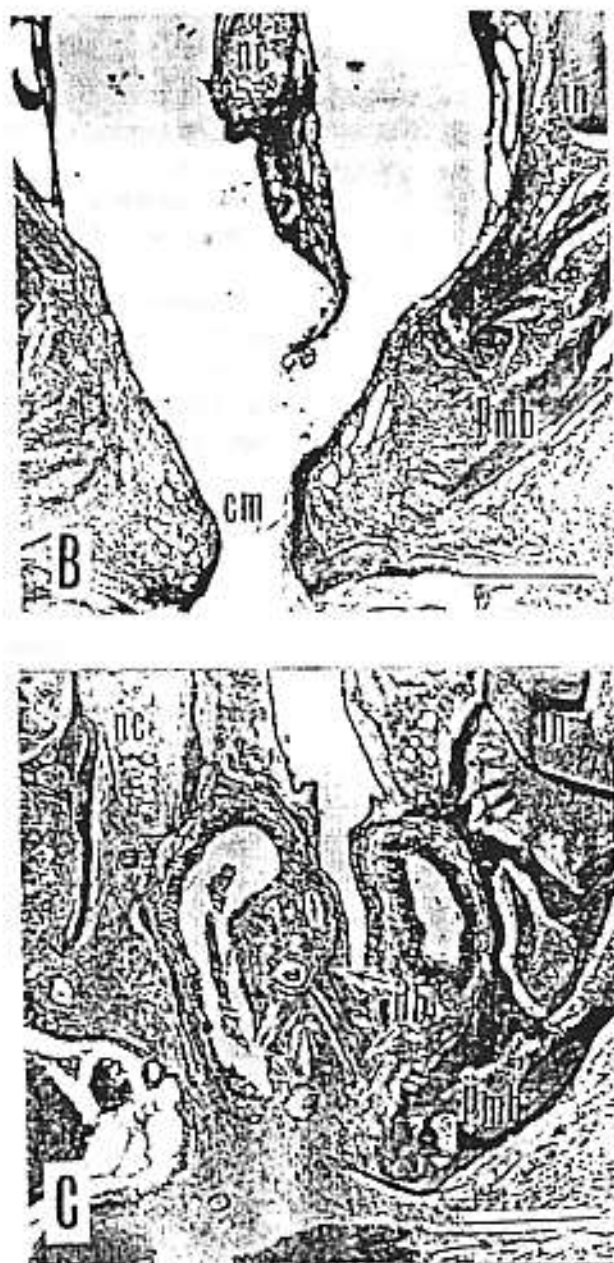


Fig. 3
Fotomicrografía del maxilar superior de animales de 16 semanas de edad (A, B y C). El injerto de hueso fue iniciado a las 8 semanas de edad (c), cuando comparado con los controles de no injertados (b). Cm; hendidura media; in, incisivo; is, sutura incisiva; nb, hueso nuevo; nc, cartilago nasal; pmb, hueso premaxilar. (Tintura de HE, barra horizontal = 520 µm.)

Discusión

Reportes esporádicos del uso de hueso para injertar en hendiduras palatinas aparecieron al inicio de siglo, pero no hasta mediados de 1950 en que la literatura incluyó publicaciones indicando que los injertos óseos estuvieron siendo utilizados tempranamente en el área del alveolo para preservar la forma del arco alveolar, estabilizar la premaxila flotante, y conseguir la erupción dentaria en el área de la hendidura. Después de esto,

algunos doctores y dentistas produjeron varias técnicas quirúrgicas y biomateriales para pacientes fisurados.

Una herida experimental de hueso que no cicatrizará espontáneamente durante el tiempo de vida del animal es denominada como defecto de tamaño crítico (Schmitz y Hollinger, 1987). Freeman y Turnbull (1973), mostraron que un defecto de 2 mm de diámetro hecho a través del periostio y hueso parietal de ratas de 500g no cicatrizó con formación de hueso nuevo en 12 semanas.

En este estudio, un defecto con trépano de diámetro de 1,2 mm, libre de periostio, fue preparado en la premaxila en ratas de 8 semanas de vida. Los defectos de trépano premaxilares en el grupo de no injertados no fueron reparados por tejido fibroso o formación de hueso. Por tanto, un conveniente defecto óseo en el que para probar los materiales sustitutos en hueso premaxilar del ratón deberá ser de 1,2 mm de diámetro.

Estos resultados indican que esta herida ósea no cicatrizada de la premaxila del ratón puede ser útil como modelo para estudiar el efecto de agentes osteoinductores en la cicatrización de hendiduras alveolares.

La apariencia más común de hendiduras maxilares humanas es una de comunicación oronasallineada por epitelio. Sin embargo, para evitar el problema de infección, nosotros trasplantamos hueso de tejido condroide inmediatamente luego de preparar el defecto del trépano el hueso premaxilar. Estuvimos buscando un material de trasplante para el hueso nuevo en la hendidura del paladar. Yasui *et al.* (1997) y Sato *et al.* (1998) reportaron que el tejido entre hueso y cartilago fue tomado directamente por condroicitos, con transición de tejido fibroso a hueso ocurriendo gradual y consecutivamente sin invasión capilar. Este hueso es el resultado de distracción autógena osteogénica. El trasplante óseo dentro del hueso condroide fue caracterizado por formación y remodelamiento 30 días después del trasplante. En conclusión, nuestros hallazgos demostraron por primera vez que el trasplante óseo dentro del hueso condroide puede ser utilizado clínicamente en defectos óseos craneofaciales para mejorar el tratamiento de autoinjertos óseos.

BIBLIOGRAFIA

1. AMES JR, RYAN DE, MAKI KA: the autogenous particulate cancellous bone marrow graft in alveolar clefts. A report of forty-one cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 51:588- 591, 1981.
2. BENTZ H, NATHAN RM, ROSEN DM, ARMSTRONG RM, THOMPSON AY, SEGARINI PR, MATHEWS MC, DASCH JR, PIEZ KA: Seyedin SM: Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem* 264:20805-20810, 1989.
3. FREEMAN E, TURNBULL RS: The value of osseous coagulum as a graft material. *J Periodontol Res* 8:229-236, 1973.
4. LUYTEN FP, CUNNINGHAM NS, MA S, MUTHUKUMARAN N, HAMMONDE RG, NEVINS WB, WOODS WI, REDDI AH: Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 264:13377 - 13380, 1989.
5. MARX RE, MILLER RI, EHLER WJ, HUBBARD G, MALININ TI: A comparison of particulate allogeneic and particulate autogenous bone grafts into maxillary alveolar clefts in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 42:3 - 9, 1984.
6. SATO M, YASUI N, NAKASE T, KAWAHATA H, SUGIMOTO M, HIROTA S, KITAMURA Y, NOMURA S, OCHI T: Expression of bone matrix proteins m RNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 13:1221 - 1231, 1998.
7. SCHMITZ JP, HOLLINGER JO: Restoration of bone discontinuities in dogs using a biodegradable implant. *J Oral Maxillofac* 45:594 - 600, 1987.
8. TAKANO - YAMAMOTO T, KAWAKAMI M, SAKUDA M: Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone - inductive agents. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 887-891, 1993.
9. URIST MR, HUO YK, BROWNELL AG, HOHL WM, BUYSKE J, LIETZE A, TEMPST P, HUNKAPILLER M, DELANGE RJ: Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:371 - 375, 1984.
10. WOZNEY JM, ROSEN V, CELESTE AJ, MITSOCK LM, WHITTERS MJ, KRIZ RW, HEWICK RM, WANG EA: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528 - 1534, 1988.
11. YASUI N, SATO M, OCHI T, KIMURA T, KAWAHATA H, KITAMURA Y, NOMURA S: Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 79:824 - 830, 1997.