

## Estudio experimental de la aplicación y biocompatibilidad de un nuevo cemento óseo de baja toxicidad

J. A. de Pedro Moro, B. de la Torre Escudero, J. F. Blanco Blanco, M. Salvado Muñoz, B. Vázquez Lasa\*, J. San Román del Barrio\*, F. de Paula Collía Fernández

### Introducción

Las aminas aromáticas terciarias son actualmente utilizadas como activadores en el proceso de curado de los cementos óseos acrílicos<sup>1</sup>. Las formulaciones comerciales de cementos óseos acrílicos contienen usualmente N,N-dimetil-4-toluidina (DMT), en una concentración que varía entre 1.5 y 2.5% p/p, como activador en la polimerización del monómero de metilmetacrilato (MMA) iniciado por el peróxido de benzoilo (BPO)<sup>2</sup>. La toxicidad del sistema de iniciación amina/BPO está relacionada con la movilidad de la amina. Se ha objetivado pequeñas cantidades de amina DMT en cementos curados tras su almacenamiento, o tras un periodo de implantación de los mismos<sup>3</sup>. Bosch<sup>4</sup> et al. demostraron la presencia de cantidades que varían entre 0.05 y 0.71% p/p en cementos implantados durante 2.5-10 años. Otros estudios<sup>2,5,6</sup> reportaron un contenido promedio de aminas aromáticas en cementos óseos acrílicos de 0.1-0.5% p/p. Por otra parte, las aminas aromáticas son compuestos de bajo peso molecular, por lo que pueden liberarse del cemento a los tejidos de alrededor<sup>2,6</sup>. Stea<sup>7</sup> et al. analizaron la liberación de DMT mediante cromatografía líquida y demostró que hay una correlación entre la cantidad de DMT liberada y los efectos citotóxicos sobre la replicación celular. Además, la DMT provoca alteraciones cromosómicas<sup>8</sup> e inhibe la síntesis proteica interfiriendo en el proceso de mineralización<sup>9</sup>.

Por tanto, la búsqueda debe ir encaminada hacia aminas terciarias, como aceleradores del proceso de la polimerización, que sean menos tóxicas, que proporcionen una temperatura pico sensiblemente inferior a la que se obtiene con las formulaciones comerciales y que su liberación al medio sea escasa, sin que se afecten las propiedades mecánicas de los cementos óseos.

Estudios recientes han aportado la aplicación de algunas aminas aromáticas terciarias con reducida toxicidad<sup>6</sup> para el proceso de curado de cementos óseos acrílicos<sup>10</sup>.

En este trabajo se estudia la compatibilidad tisular *in vivo* de un cemento óseo acrílico formulado con una amina de reducida toxicidad, la 4,4'-bisdimetilaminobenzidrol (BZN). Esta amina es un compuesto comercial y ha sido elegida debido a su similitud desde el punto de vista estructural al violeta de genciana, el cual posee propiedades antisépticas. La finalidad del estudio ha sido la caracterización de una nueva amina activadora para el curado de cementos óseos acrílicos, la caracterización de los cementos curados con la nueva amina, y el análisis histológico de su biocompatibilidad basado en las directrices pautadas por la Norma Española UNE-EN ISO 10993-1, con los objetivos de: definir la respuesta celular inflamatoria, tanto aguda como crónica, sobre tejido conectivo y sobre tejido óseo; evaluar los efectos tóxicos locales sobre los tejidos y determinar la neoformación ósea producida con las distintas formulaciones.

### Material y métodos

La amina de toxicidad reducida incorporada en este trabajo es la 4,4'-bisdimetilaminobenzidrol (BZN) (Sigma), que se ha empleado sin purificar, al igual que la amina del cemento óseo control, la N,N-dimetil-4-toluidina (DMT) (Merck).

Se evaluó la **toxicidad aguda** del nuevo activador comparándolo con la DMT, se analizó con ratones machos de raza SPF-NMR1 de peso 25±3 gr (cada animal se pesó de forma individualizada para calcular la cantidad real administrada). Se administraron en la vena caudal del ratón soluciones salinas de los correspondientes clorhidratos, debido a la escasa solubilidad de estas aminas en medio salino acuoso. La dosis letal promedio y la curva fue calculada mediante un análisis *probit* programado (Finney) desde el porcentaje de animales muertos, observados durante el periodo de siete días tras la administración<sup>6</sup>.

Para analizar la **citotoxicidad** de ambas aminas, tanto el control, como la experimental, se incubaron leucocitos polimorfonucleares de peritoneo de rata con los distintos compuestos a ensayar (DMT y BZN). Este estudio está ba-

Centro: Servicio de Traumatología, Hospital Universitario de Salamanca.

\* Instituto de Polímeros, CSIC, Madrid.

Correspondencia: José Antonio de Pedro Moro. Unidad Docente de Traumatología. Facultad de Medicina

Avda. Alfonso X El Sabio. 37007, Salamanca

Tel.: 923294400 (Ext.:1965), 923291100, Fax: 923294558

E-mail: jpedrom@usal.es

Medicina Balear 2003; 18: 30-38

sado en la reacción bioquímica de transformación de piruvato en lactato, catalizada por la lactatodeshidrogenasa (LDH) en presencia de NADH como cofactor<sup>11</sup>. Dependiendo de la actividad citotóxica de la amina añadida al medio de cultivo (DMT o BZN), se liberó al medio mayor cantidad de enzima LDH. Esta LDH convirtió los sustratos en lactato y NAD<sup>+</sup>. La desaparición de NADH se midió espectrofotométricamente. Como control, se utilizaron células incubadas en el disolvente (dimetilsulfóxido, DMSO), y como control de máxima ruptura se utilizaron células tratadas con detergente (Triton).

La **actividad antimicrobiana** se ensayó bien en medio de cultivo Mueller Hinton (Difco) con bacterias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*) o en YED con *Candida albicans*. La incubación se hizo a 37°C en todos los casos.

Los ensayos de dilución de micro-cultivos se realizaron en microplacas de 96 pocillos con 90ml. del medio y 10ml. del inóculo en cada pocillo. Se prepararon diluciones por duplicado de cada compuesto en cada fila de pocillos, con un intervalo de concentración de 5% a 0,02% (p/v). Se incluyó el DMSO en una fila en un intervalo de concentraciones de 10% a 0,04% (v/v), y una fila se dejó únicamente con medio para ser tomada como control positivo. El tamaño del inóculo se ajustó por espectrofotometría a una densidad óptica (DO) de  $DO_{550} = 0,02$ , correspondiendo a una densidad de  $2 \times 10^5$  céls./ml. Se añadieron 10ml. de inóculo a cada pocillo y las placas se incubaron durante 24 h. La  $DO_{550}$  se determinó después de cada incubación usando un scanner de microplacas (Organon Teknika, modelo 510), y la concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la dilución que provoca una reducción del 80% de la densidad óptica con respecto al control positivo<sup>6</sup>.

#### ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CEMENTO CURADO CON LA NUEVA AMINA

El cemento experimental fue preparado añadiendo el componente líquido al componente sólido a temperatura ambiente. La relación sólido-líquido fue de 2:1 en todos los casos. El componente sólido consistió en perlas de PMMA a las que se añadió el iniciador BPO en una concentración de 1,5% p/p con respecto a la fase sólida en todos los casos, la cual está en el intervalo de concentraciones (0,75-2% p/p) usadas en los cementos óseos comerciales. Como agente radiopaco se añadió dióxido de zirconio ( $ZrO_2$ ) en una concentración del 10% p/p con respecto a la fase sólida. El componente líquido consistió en MMA al que se añadió el BZN, a una concentración de 1% p/p con respecto a la fase líquida.

Para la preparación de los cementos óseos se vertió el contenido líquido en un recipiente estéril, donde previamente se colocó el componente sólido. Se removieron lentamente los dos componentes hasta conseguir una mezcla completa a una frecuencia de 30-40 batidas por minuto. La mezcla, inicialmente se encuentra en un estado semilíquido, pasando posteriormente, al cabo de unos 2-3 min. aproximada-

mente, a un estado pastoso, estado en el que el cemento puede moldearse para su posterior aplicación.

#### ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS DE CURADO

Los parámetros de curado, esto es, el tiempo de fraguado y la temperatura máxima que alcanza la masa reaccionante, se determinaron de acuerdo a la norma ASTM F451-86<sup>12</sup>. La variación de la temperatura de esta masa con el tiempo se registró de forma automática por medio de un termopar conectado a un medidor de temperatura de alta sensibilidad. Para ello se utilizó un molde de Teflón cilíndrico de 10 mm. de diámetro y 15 mm. de altura, que reproduce las condiciones del molde descrito en la norma ASTM mencionada. El termopar se introdujo en el centro de la masa, localizado a 5 mm. del fondo del cilindro de Teflón. Se midió el tiempo desde el comienzo de la mezcla registrándose la temperatura del sistema cada 5 seg. durante 30 min. Las exotermas de polimerización se registraron a 25°C.

#### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE MONÓMERO RESIDUAL

El contenido global de monómero residual (%Mr) en muestras de cemento después de una hora de reacción a 37°C se determinó por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón, <sup>1</sup>H RMN. Los espectros de resonancia fueron registrados a temperatura ambiente utilizando cloroformo- $d_3$  como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna en un espectrofotómetro VARIAN VXR-300 operando a 75,5 MHz.

Para la caracterización de los espectros de resonancia se tuvieron en cuenta las referencias bibliográficas<sup>13</sup> y, a partir de ellas, el porcentaje de monómero residual en las muestras se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\%Mr = (1,5 A_v / A_M) \times 100$$

donde  $A_M$  es la media de la integral de la señal correspondiente al grupo metoxilo,  $A_v$  es el valor medio de la integral correspondiente a los grupos vinílicos y 1,5 es un factor que relaciona el número de protones en la región vinílica (dos) con los correspondientes a los del grupo metoxilo (tres).

#### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RESIDUAL DE AMINA

Para la determinación de la concentración residual de la amina BZN en el cemento formulado en este trabajo se utilizaron muestras trituradas y se sometieron a extracción en etanol a temperatura ambiente durante 10 días. La liberación de la amina terciaria con el tiempo (9 días, 3 y 6 meses) fue seguida en solución salina (0,9% p/v) por inmersión de muestras en forma de película ( $3 \times 1 \text{ cm}^2$ ) de 0,5 mm. de espesor, preparándose cementos con concentración de aminas equimoleculares, correspondiendo a un 0,5% p/p de DMT y 1% p/p de BZN. La determinación cuantitativa de activadores en solución salina o en etanol, se llevó a cabo mediante espectroscopía UV midiendo la intensidad del pico a  $\lambda_{\text{máx.}} = 240 \text{ nm}$  para DMT y 260 nm para BZN.

## ENSAYOS DE BIOCOPATIBILIDAD

En este trabajo se han llevado a cabo los ensayos descritos en la Norma ISO-10993-6<sup>14</sup> que corresponden a la implantación en tejido muscular a corto plazo con un periodo máximo de 8 semanas, y los que corresponden a la implantación en tejido óseo a largo plazo con un periodo máximo de 24 semanas.

### 1. Estudio de la respuesta histológica del tejido conectivo:

El estudio histológico sobre el tejido conectivo se llevó a cabo, mediante la implantación, en la musculatura dorsal de la rata, de varillas de cemento óseo curado *in vitro* preparado con los activadores DMT y BZN. Las varillas de cemento son cilindros de 15 mm. de longitud y 3 mm. de diámetro.

Se utilizaron 10 ratas hembras de la raza Wistar, todas ellas con un peso aproximado de 250-300 gr. Los animales fueron divididos en dos series de 5 ratas cada una de ellas de acuerdo al cemento utilizado. El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo mediante una incisión cutánea longitudinal, de aproximadamente 0,5 cm., sobre el flanco izquierdo del animal. Por esta incisión se introdujo una cánula de 3,5 mm. de diámetro hasta el músculo dorsal. A través de dicha cánula, se colocaron de forma intramuscular las diferentes varillas de cemento óseo.

Una vez cumplidos los periodos de tiempo estipulados, se pasó al sacrificio de los animales mediante sobredosis de éter etílico. Posteriormente, se procedió a la inclusión de las muestras del tejido que rodea el material en parafina durante 24 h., según técnica habitual al punto de fusión de 53°C. Las muestras incluidas en parafina se seccionaron con un microtomo manual (Minot-Leniz), obteniéndose cortes de 6 micras de espesor.

Las secciones obtenidas de las piezas incluidas en parafina se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, según técnicas convencionales, mediante sucesivos pases en xilol y alcohol de distinta graduación, para su desparafinación y deshidratación.

### 2. Estudio de la respuesta del tejido óseo

Para estudiar la respuesta del tejido óseo se procedió a la implantación del cemento en su estado pastoso en la cavidad medular de la epífisis y diáfisis del fémur de conejo. Se utilizaron un total de 20 conejos adultos hembras de la raza Nueva Zelanda de peso medio 3,820 Kg (3,450-4,260 Kg), y una edad de tres meses al comienzo del estudio, y se subdividieron en dos series de acuerdo a la formulación utilizada en cada una de ellas. La inserción de cada formulación se llevó a cabo en ambos fémures del animal. Cada serie se subdividió en cinco grupos de acuerdo a la fecha de sacrificio de los mismos.

Se seleccionó como área idónea para la implantación del cemento el nivel metafiso-epifisario distal del fémur del

conejo, para conseguir que toda la superficie del implante quede rodeada de tejido óseo. Se utilizó el mismo método anestésico, cuidado antiséptico y técnica quirúrgica en todas las intervenciones. Simultáneamente a la anestesia se realizó profilaxis antibiótica con la asociación de penicilina (240000 UI) y estreptomycin (300 mg) por vía IM, según protocolo.

Se accedió al área seleccionada mediante vía de abordaje latero-externa, se practicó una incisión cutánea en la cara lateral, desde el borde lateral de la rótula en sentido oblicuo y ascendente, se incidió el tabique intermuscular y se desperiostizó el área seleccionada para la colocación del implante, desde el epicóndilo lateral hasta el tercio medio-distal de la diáfisis.

Con ayuda de un pequeño punzón de 3 mm. se marcó e inició el punto de entrada de la broca. Seguidamente, se utilizó una broca de 3,2 mm. montada en motor de bajas revoluciones para perforar el hueso en todo su espesor. Se procedió de igual forma en la cara externa del tercio distal de la diáfisis femoral.

A continuación, se procedió a la preparación del correspondiente cemento óseo cuando la mezcla adquirió una consistencia pastosa, se introdujo en una jeringa de 10 ml previa la extracción de su émbolo. Posteriormente, ayudado por la cánula intravenosa se introdujo la mezcla en los defectos óseos efectuados en el fémur del conejo. Taponados los dos orificios, se esperó aproximadamente unos 10 minutos para permitir el fraguado completo del cemento (Figura 1).

Los implantes se siguieron radiológicamente, mediante una proyección anteroposterior a dos intervalos de tiempo, 4 y 24 semanas. Las imágenes radiológicas se obtuvieron con un aparato MAMMODIAGNOSTUC (Philips).

Cuando los animales cumplieron sus períodos de ensayo, se sacrificaron mediante inyección de Pentotal<sup>®</sup>, se aislaron sus fémures, se procedió a su limpieza de partes blandas y posteriormente se tomaron porciones diafisarias de hueso que portaban el cemento.

Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10%, y así se conservaron hasta el momento de su decalcificación, la cual, se llevó a cabo por medio de la técnica de formol nítrico (950 ml de formol al 10% y 50 ml de ácido nítrico) previo a la inclusión en parafina durante 24 h. por el método habitual. Posteriormente, se realizaron cortes transversales de las muestras por las diferentes zonas de estudio, diafisaria, metafisaria y epifisaria, incluyendo estas secciones de nuevo en parafina. Éstas, se seccionaron con un microtomo manual (Minot-Leniz), obteniéndose cortes de 6 micras de espesor. Las secciones obtenidas de las piezas incluidas en parafina se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, según técnicas convencionales, mediante sucesivos pases en xilol y alcohol de distinta graduación, para su desparafinación y deshidratación.

## Resultados

### Evaluación biológica de las aminas

La **toxicidad aguda** se midió mediante la cuantificación de dosis letal de ratones, cuyos resultados fueron: LD<sub>50</sub> (mg./Kg.): DMT =75,80 (64,10-89,00) y para el BZN = 271,39 (236,78-311,07). Dichos resultados indicaron que el BZN presentó una LD<sub>50</sub> 3,58 veces mayor que el control DMT bajo las mismas condiciones experimentales, es decir, estadísticamente es necesario administrar una dosis 3,58 veces mayor de BZN que de DMT para alcanzar el 50% de mortalidad de los animales tratados.

Igualmente, resulta interesante el análisis de la mortalidad dependiente de la dosis. La gráfica 1 muestra el diagrama obtenido del análisis de los datos para los tres índices de mortalidad considerados (16, 50 y 84% de mortalidad). Los diagramas dan una idea clara del intervalo de dosis necesaria para incrementar la mortalidad de 16 a 84%. Mientras que para la DMT, el intervalo es sólo 60 mg./Kg., la amina BZN representa un intervalo de 100 mg./Kg. bajo las mismas condiciones experimentales.

La **citotoxicidad** de la DMT aumentó con la concentración, alcanzando el nivel de 52,5% (con respecto a Triton X-100 usado como control) cuando la concentración de la DMT es 1,0 M. Sin embargo, la citotoxicidad de BZN no cambió de forma apreciable con la concentración, alcanzando niveles menores del 35% para todas las concentraciones estudiadas. (0,1, 0,5 y 1 M). (Gráfica 2)

El **poder antimicrobiano** de los diferentes compuestos, de acuerdo al protocolo aplicado, se incrementa cuando los valores de CMI disminuyen. Desde un punto de vista comparativo, es probablemente mejor analizar el intervalo de valores obtenidos para las relaciones DMT/BZN. En este sentido, los resultados muestran que, contra las bacterias Gram negativas el BZN es 2 veces más activo que la DMT. Igualmente, los resultados obtenidos para las bacterias Gram positivas son muy interesantes, ya que proporcionaron un incremento en la actividad de 8 veces mayor para el

	CMI en concentración molar			Relación relativa DMT/BZN
	DMSO	DMT	BZN	
<i>E. coli</i>	0,704	0,185	0,0926	2,00
<i>P. aerug.</i>	0,704	0,185	0,185	1,00
<i>S. aureus</i>	0,704	0,185	0,023	8,04
<i>C. albicans</i>	1,408	0,185	0,023	8,04

caso del BZN. De la misma manera, se observó que para la *Candida albicans* el BZN es más activo que DMT.

### Caracterización del cemento curado con la nueva amina

#### PARÁMETROS DE CURADO

En la siguiente tabla se puede observar que el nuevo activador da lugar a exotermas con una temperatura pico inferior al control, así como un incremento en los tiempos de manipulación y de fraguado, aunque todos ellos siguieron las especificaciones estándar<sup>12</sup>.

	DMT	BZN
Tª pico (°C) [S.D.]	83,0 [1,5]	74,7 [0,56]
t. de fraguado (min.) [S.D.]	10,2 [0,10]	10,5 [0,14]

#### CONTENIDO DE MONÓMERO RESIDUAL

A continuación se detallan los valores de monómero residual obtenidos con la formulación experimental comparados con la amina del cemento comercial. Se observó que el porcentaje de monómero residual es independiente del tipo de activador usado. Por tanto, podemos considerar que la efectividad del sistema BPO/BZN, iniciador de la polimerización radical de PMMA, es similar a la del sistema BPO/DMT utilizado en los cementos óseos comerciales.

	DMT	BZN
Contenido de monómero residual (%peso) [S.D.]	1,9 [0,25]	2,5 [0,46]

#### CONTENIDO RESIDUAL DE AMINA Y DE SU LIBERACIÓN EN SOLUCIÓN SALINA

Se ha obtenido una concentración residual de 0,20% p/p para la DMT, lo que significa una reducción del 60% con respecto a la concentración inicial. La concentración residual de BZN fue de 0,66% p/p, lo que implica un 34% de reducción con respecto a la concentración inicial. Esto revela la capacidad de la nueva amina para participar en la reacción de polimerización y ser incorporada en el cemento.

Por otra parte, con relación a la liberación de la amina en solución salina se obtuvieron resultados detectables a 3 y 6 meses pero no después del periodo



inicial de nueve días, y la concentración de la amina en el medio no cambió después de los tres meses. Estas concentraciones fueron de 24 ppm para DMT y 15 ppm para BZN. Por lo tanto, el contenido de amina aromática liberado en solución salina fue considerablemente inferior para el cemento formulado con el nuevo activador que para el cemento control que contenía DMT.

### Respuesta histológica del tejido conectivo

Después de cuatro semanas de implantación, en ambos casos, se ha observado en el tejido que rodea al implante la formación de una membrana fibrosa infiltrada por leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y eosinófilos. No se aprecia, igualmente, zonas de necrosis alrededor del lugar ocupado por el material, como es de esperar debido a la implantación del cemento curado "*in vitro*".

A las ocho semanas de la implantación la membrana de tejido conectivo laxo ha progresado hasta convertirse en una verdadera membrana, fácilmente reconocible, rica en fibras de colágeno perfectamente orientadas, y que forman una pseudocápsula alrededor del implante. Se aprecian abundantes fibrocitos entremezclados entre las fibras de colágeno. El componente celular inflamatorio visto en las etapas iniciales, ha disminuido, pero aún se aprecian eosinófilos, algún macrófago y de forma característica algunas células cebadas, que traducen el mecanismo de defensa intrínseco del tejido conectivo. Del mismo modo que en las etapas previas, no se observan grados de necrosis en el tejido que rodea al material. Tampoco se aprecia diferencia alguna en cuanto a la respuesta tisular entre los dos tipos de formulaciones ensayadas.

Por tanto, los cambios producidos sobre las partes blandas dependen de la duración del implante, observando que se produce un notable aumento del tejido fibroso, que empieza siendo un tejido laxo, para convertirse en un tejido denso regular.

### Respuesta histológica del tejido óseo

Se ha estudiado la respuesta del tejido óseo a la implantación de las formulaciones en estado pastoso para la polimerización de las mismas en la cavidad endomedular del fémur durante un periodo entre dos días y 24 semanas. Durante este tiempo ninguno de los animales mostró signos de infección en el área del implante.

Las preparaciones histológicas de la serie de animales sacrificados a 1-2 días, en los dos tipos de formulaciones ensayadas, muestran en primer lugar la

presencia de unas zonas de necrosis celular próximas a los restos de cemento óseo, compatible con una necrosis térmica o química en la cavidad medular. La etiología de esta necrosis no puede ser claramente definida. Se aprecian núcleos celulares picnóticos o fragmentados, englobados en una sustancia eosinófila amorfa. Así mismo, se observa una clara delimitación de estas zonas necróticas con el resto de tejido. Se observan restos del material ensayado, pudiendo apreciar la fluorescencia que presentan los restos de material en comparación con el tejido adiposo medular. Alrededor de estos restos de cemento se ven leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), que traducen la respuesta inflamatoria aguda reactiva a la agresión que se ha producido. No se encontraron diferencias apreciables en la respuesta inflamatoria aguda entre las dos formulaciones. En zonas más alejadas de los restos de material, se observa un abundante infiltrado de células mononucleares, representadas fundamentalmente por eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. El tejido óseo propiamente dicho presenta, en las trabéculas medulares, procesos de osteosíntesis demostrados por la presencia de una matriz ósea aún no mineralizada u osteoide. Esta distribución se aprecia claramente en las superficies opuestas a donde se evidencian los restos del material de ensayo (Figuras 2 y 3).

El estudio histológico en el periodo de dos semanas refleja escasas modificaciones con respecto al periodo anterior en cuanto a las zonas de necrosis celular y a la respuesta inflamatoria producida. No ocurre lo mismo con la neoformación ósea, pues ésta comienza a intensificarse de forma notable, traduciendo el comienzo de la fase de reparación. La formulación que contiene BZN presenta claramente una mayor reacción osteogénica consistente en la neoformación de trabéculas óseas en relación con el sistema circunferencial interno en la diáfisis.

A las cuatro semanas se observan restos necróticos, en menor cantidad que en el periodo anterior, lo que traduce el proceso de reabsorción llevado a cabo por los macrófagos. La respuesta inflamatoria continúa su proceso reparativo, pasando a observarse mayor cantidad de macrófagos y células gigantes multinucleadas como células fundamentales que rodean los restos de los dos tipos de cemento. En cuanto a la neoformación ósea, es de destacar la importante diferencia encontrada a las cuatro semanas en el caso del cemento formulado con BZN. Éste presenta una más rápida y mayor neoformación, caracterizada por la presencia de un ribete eosinófilo más abundante que traduce el depósito de osteoide. Esta neoformación ósea adquiere la ca-

racterística morfológica de englobar los restos de material.

La respuesta histológica después de 12 semanas de implantación puso de manifiesto que el proceso es similar y continúa la misma dinámica descrita previamente, esto es, aún se siguen viendo restos necróticos con los dos tipos de cementos, si bien algo menos marcada para el caso del cemento formulado con BZN, lo que indirectamente traduce la mayor neoformación ósea que se produce en el grupo ensayado con este cemento experimental. La mayor diferencia se encuentra en la neoformación ósea que se con cemento óseo formulado con BZN. Se puede observar la gran proliferación de trabéculas óseas en relación con el implante de cemento. Este nuevo tejido óseo se está formando por aposición de láminas de osteoide.

Por último, en el periodo de 24 semanas, la respuesta histológica sigue la misma tendencia que la observada en periodos precedentes. La formación ósea que se aprecia en el grupo tratado con cemento experimental formulado con BZN demuestra la confluencia de las trabéculas óseas, sobre todo en la diáfisis, de tal forma que el espesor de hueso neoformado es más notable que con la otra formulación estudiada (Figura 3 y 4). En ésta, las trabéculas óseas no están tan definidas, encontrándose menor confluencia de las mismas. Esta disposición laminar del tejido neoformado es un reflejo de los patrones de fuerza que experimenta el fémur del animal.

## Discusión

Las desventajas biológicas del cemento óseo convencional están bien establecidas. Se sabe que produce necrosis en el tejido óseo e impide el flujo sanguíneo al mismo<sup>15,16</sup> siendo atribuido esto a su alta temperatura de polimerización<sup>17</sup> y a la liberación de compuestos de toxicidad química durante su fraguado in vivo<sup>18,19</sup>. Teniendo en cuenta estos factores, la finalidad del presente trabajo ha sido el mejorar la respuesta biológica al cemento óseo, utilizando una nueva amina para el proceso de curado, sin afectar las propiedades mecánicas del mismo. Para ello, y de acuerdo a la Norma ISO, se ha estudiado la toxicidad que muestra esta nueva amina y su actividad antimicrobiana, así como los parámetros de curado, el contenido de monómero residual, el contenido residual de la amina y su liberación al medio en el cemento formulado con la misma. Del mismo modo, se ha estudiado el comportamiento del cemento experimental preparado con el nuevo activador en cuanto a sus propiedades mecánicas. Por último, se ha evaluado la biocompatibilidad que ha

presentado, tomando como respuesta control la producida por el cemento comercial CMW<sub>3</sub> (DePuy).

Hay numerosos estudios acerca de la citotoxicidad de los cementos óseos comerciales<sup>20,21</sup>, pero pocos se han encontrado que traten de forma específica de la toxicidad de los activadores. Es por esto, que la introducción de las nuevas aminas necesita de unos estudios de toxicidad de las mismas.

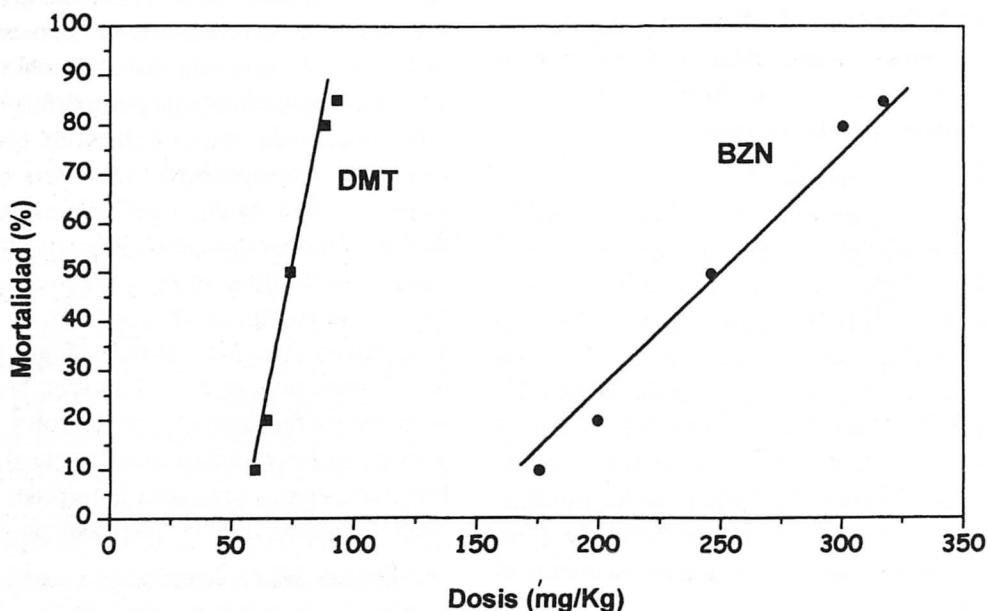
Con cada una de las observaciones y los resultados obtenidos se puede predecir que cemento será más efectivo y que ventajas físicas y biológicas puede suponer este tipo de implante. Uno de los problemas más relevantes de la formación del cemento es la toxicidad, se piensa que está directamente relacionada con la elevada temperatura de polimerización que también está relacionada con el tiempo de fraguado. Cuanto menor sea la temperatura menor será el tiempo de fraguado y habrá menor liberación de monómero residual y así menor toxicidad. Además dicha temperatura parece que también implica un aumento de tejido dañado y de respuesta inflamatoria, lo que supone un aumento en el número de macrófagos y células gigantes. La presencia de macrófagos en la interfaz cemento-hueso ya fue descrita por Charnley en 1970, considerando que es una respuesta directa al cemento<sup>22</sup>. Pero Freeman, menos optimista, interpreta dicha respuesta como la evidencia de la "respuesta tisular" al PMMA<sup>23</sup>.

Otra de las características a reseñar en la respuesta tisular a la implantación intraósea, es la temprana neoformación ósea, Charnley lo interpreta como tejido óseo que está siendo desmineralizado<sup>24</sup>. Lintner<sup>25</sup> y Dellinger<sup>26</sup> interpretaron este hallazgo como una señal de mineralización alterada debido a los efectos tóxicos del cemento óseo. En cualquiera de los casos, en este trabajo se ha demostrado la neoformación ósea por aposición en los dos tipos de formulaciones, siendo de mayor intensidad y de mayor rapidez con el cemento ensayado con BZN, observando hueso viable en aposición directa a los restos de material, sin interposición de fibrocartilago.

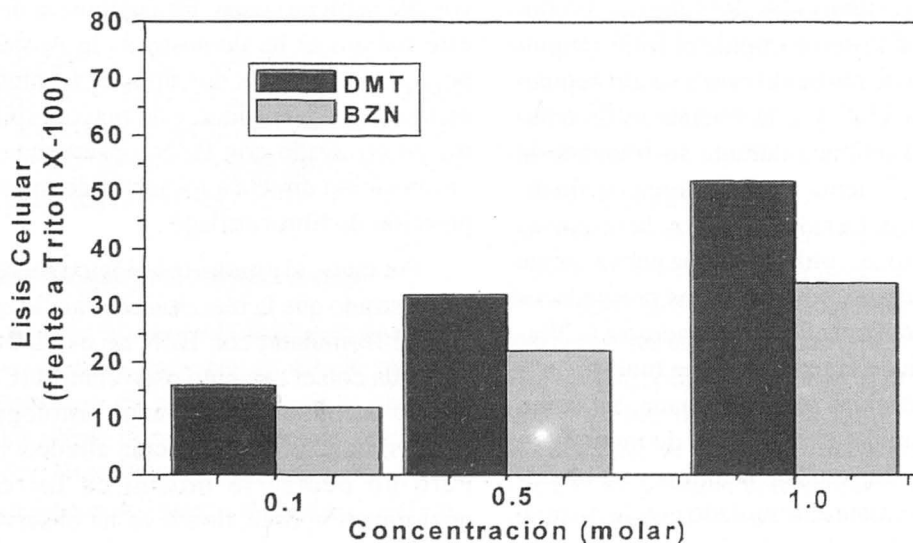
Por tanto, el estudio histológico sobre el tejido óseo ha mostrado que la reacción celular al cemento experimental formulado con BZN no es diferente de la encontrada con el cemento óseo control (CMW<sub>3</sub>), no habiendo encontrado diferencias histológicas significativas en la necrosis producida alrededor del material. Pero no ocurre lo mismo en lo referente a la neoformación ósea, donde se ha observado marcadas diferencias de la formulación ensayada con la amina BZN. Destaca la temprana neoformación ósea, que comienza a observarse en el periodo de 1-2 días, continuando de forma progresiva. A las 4 semanas ya se

detecta aposición ósea con su ribete de osteoide. Estas características histológicas sugieren una marcada actividad celular, más notable en el caso del cemento formulado con BZN. A un periodo mayor, la neoformación ósea adquiere la característica formación lamelar. Este proceso ocurre de forma más marcada y más rápida, igualmente, con el cemento BZN, englobando los restos de material y adquiriendo la disposición característica de los sistemas de Havers, con el hueso laminar circunferencial conteniendo los osteocitos en sus lagunas, conectadas entre ellas por los canalículos.

En la corta etapa de estudio de implantes de cementos óseos aún no podemos evidenciar aunque si predecir buenos resultados a largo plazo. Los nuevos implantes que se están utilizando en estudios experimentales<sup>27,28</sup> presentan propiedades radioactivas lo que nos permite visualizarlos para estudiar la evolución del implante. Así con el paso de los años podremos establecer las características de cada implante para cada persona obteniendo cada vez resultados más beneficiosos para la mejora de la calidad de vida.



Gráfica 1. Relación entre los porcentajes (16%, 50% y 84%) de mortalidad de aminas terciarias determinada por inyección intravenosa en ratones de una sola solución salina al 5% de los correspondientes clorhidratos



Gráfica 2. Efectos de DMT y BZN sobre la integridad de leucocitos polimorfonucleares, medidos en términos de enzima lactatodeshidrogenasa liberada. Los resultados muestran la lisis celular promedio (%) con respecto a Tritón X-100 tomado como control



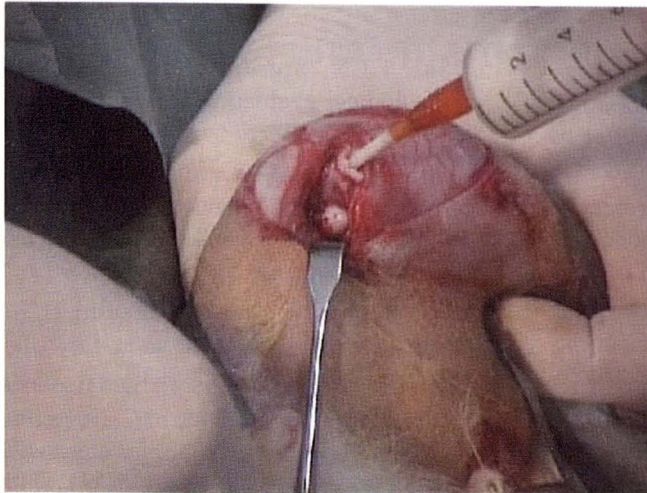


Figura 1. Introducción del cemento óseo en la epífisis femoral

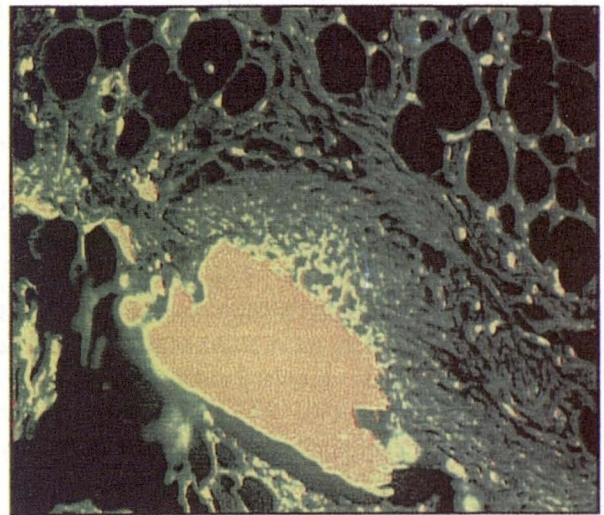
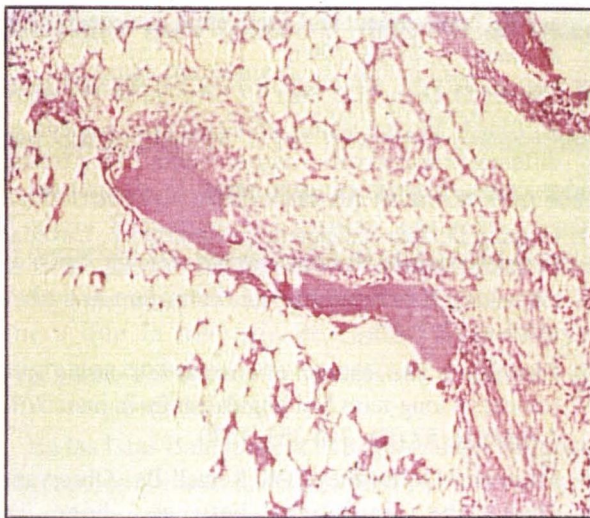


Figura 2. Grupo tratado con BZN (1-2 días) Trabéculas óseas con frentes de osificación traducidos por la presencia de una matriz ósea mineralizada u osteroide en la región epifisiana femoral. H/E (4x). Figura 3. Grupo tratado con BZN (1-2 días). Microfotografía de fluorescencia a mayor aumento (20x) que muestra la marcada fluorescencia del tejido óseo en comparación de la matriz ósea no mineralizada, con una menor fluorescencia

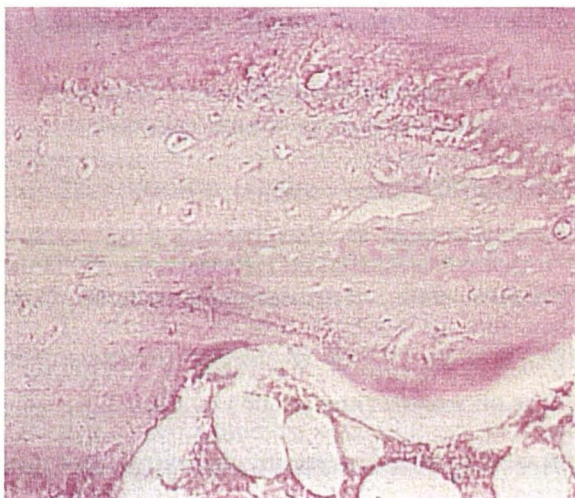


Figura 4. Grupo tratado con BZN (24 ss). Diáfisis femoral mostrando la disposición laminar que adquiere la formación ósea, con lagunas conteniendo los osteocitos H/E (20x)

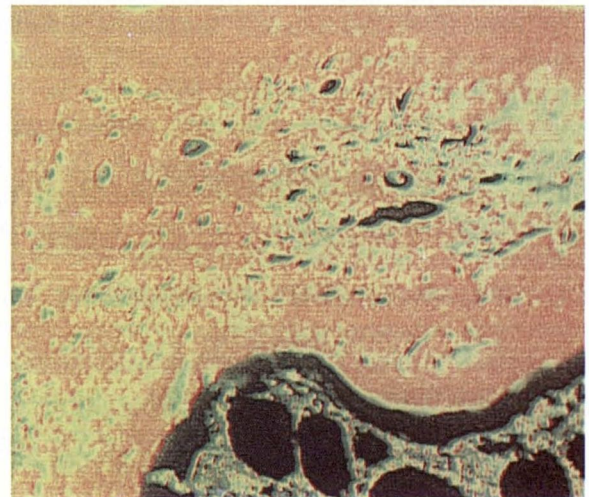


Figura 5. Microfotografía de fluorescencia (20x) donde se aprecia la marcada fluorescencia del tejido óseo neoformado. Adipocitos medulares que no presentan fluorescencia



## BIBLIOGRAFÍA

1. Brauer GM, Steinberger DR, Stansbury JW. Dependence of curing time, peak temperature and mechanical properties on composition of bone cement. *J Biomed Mater Res*, 20: 839-852, 1986.
2. Trap B, Wolff P, Jensen JS. Acrylic bone cements: residuals and extractability of methacrylate monomers and aromatic amines. *J Appl Biomater*, 3: 51-57, 1992.
3. Brauer GM, Termini DJ, Dickson G. Analysis of the ingredients and determination of the residual components of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res*, 11: 577-607, 1977.
4. Bosch P, Harms H, Lintner F. Detection of catalytic constituents of dimethyl-p-toluidine even after long term implantation. *Arch Toxicol*, 51: 157-166, 1982.
5. Ege W, Scheuermann H. Release of rest monomers and N,N-dimethyl-p-toluidine from bone cements during aging and long-term placement- -an in vitro study. *Aktuelle Prob Chir Orthop*, 31: 79-82, 1987.
6. Liso PA, Vázquez B, Rebuelta M, Hernández ML, Rotger R, San Román J. Analysis of the leaching and toxicity of new amine activators for the curing of acrylic bone cements and composites. *Biomaterials*, 18: 15-20, 1997.
7. Stea S, Granchi D, Zolezzi C, Ciapetti G, Visentin M, Cavedagna D, Pizzoferrato A. High-performance liquid chromatography assay of N,N-dimethyl-p-toluidine released from bone cements: evidence for toxicity. *Biomaterials*, 18: 243-246, 1997.
8. Tanager M, Pasquini R, Bonatti S. Genotoxicity analysis of N,N-dimethylaniline and N,N-dimethyl-p-toluidine. *Environ Mol Mutagen*, 21: 349-356, 1993.
9. Bosch P, Harms H, Lintner F. Toxicity of bone cement component. *Aktuelle Probl Chir Orthop*, 31: 87-89, 1987.
10. Vázquez B, Elvira C, Levenfeld B, Pascual B, Goñi I, Gurruchaga M, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA, Liso PA, Rebuelta M, San Román J. Application of tertiary amines with reduced toxicity to the curing process of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res*, 34: 129-136, 1997.
11. Payá M, Goodwin PA, De Las Heras B, Hoult JR. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. *Biochem Pharmacol*, 48: 445-451, 1994.
12. ASTM. Specification F451-86. Standard specification for acrylic bone cement, 1986 Annual Book of ASTM Standards. Medical Devices. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1986.
13. Pham QT, Petiaud R, Waton H. Proton and Carbon NMR Spectra of Polymer. Penton Press. London, 1991.
14. ISO. Versión oficial en Español de la Norma Internacional, ISO-10993/1: 1997. Evaluación biológica de productos sanitarios. Norma Española, 1998.
15. Jensen LN, Sturup J, Kramhoft M, Jensen JS. Histological evaluation of cortical bone reaction to PMMA cement. *Acta Orthop Belg*, 57: 254-259, 1991.
16. Sturup J, Madsen J, Tondevold E, Jensen JS. Decreased blood perfusion in canine tibial diaphysis after filling with acrylic bone cement compared with inert bone wax. *Acta Orthop Scand*, 61: 143-147, 1990.
17. Liu YK, Park JB, Njus GO, Stienstra D. Bone-particle-impregnated bone cement: an in vitro study. *J Biomed Mater Res*, 21: 247-261, 1987.
18. Mazzullo S, Paolini M, Verdi C. Numerical simulation of thermal bone necrosis during cementation of femoral prostheses. *J Math Biol*, 29: 475-494, 1991.
19. Kindt-Larsen T, Smith DB, Jensen JS. Innovations in acrylic bone cement and application equipment. *J Appl Biomater*, 6: 75-83, 1995.
20. Ciapetti O, Granchi D, Stea S, Cervellati M, Pizzoferrato A, Toni A. In vitro testing of the ten bone cements after different time intervals from polymerization. *J Biomater Sci Polym Ed*, 11: 481-493, 2000.
21. Oranchi D, Stea S, Ciapetti O, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. In vitro effects of bone cements on the cell cycle of osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 16: 1187- 1192, 1995.
22. Charnley J. The reaction of bone to self-curing acrylic cement. A long-term histological study in man. *J Bone Joint Surg*, 52 (B): 340-353, 1970.
23. Freeman MA, Bradley GW, Rewell PA. Observations upon the interface between bone and polymethylmethacrylate cement. *J Bone Joint Surg*, 64 (B): 489-493, 1982.
24. Charnley J. Low Friction Arthroplasty of the Hip. Theory and Practice. Springer-Verlag. Berlín, New York, 1979.
25. Lintner F, Bosch P, Brand G. Tissue damage caused by PMMA bone cement. *Aktuelle Probl Chir Orthop*, 31: 172-176, 1987.
26. Delling G, Kofeldt C, Engelbrecht E. Bone and border zone changes in the use of bone cements—long-term studies of human biopsy, surgical and autopsy material. *Aktuelle Probl Chir Orthop*, 31: 163-171, 1987.
27. Revell P., Braden M., Weightman B. and Freeman M.. "Experimental study of the biological response to a new bone cement: II. Soft tissue reactions in the rat". *Clinical materials*, 10 (1992) 233-238.
28. Revell P., Freeman M., Weightman B. and Braden M.. "The intraosseous implantation of a new bone cement polyethylmethacrylate n-butyl methacrylate in the dog". *Proc. Fourth World Biomaterials Congress, Berlin*, 1992: 166.