

UN PROCESO DE DESANTIGENIZACIÓN ENZIMÁTICA PERMITE ALCANZAR LA REMODELACIÓN FISIOLÓGICA E INCLUSO OBTENER MATERIALES OSTEOPROMOTORES PARA INJERTO ÓSEO

S. Pagnutti, S. Maggi, D. A. Di Stefano, M. Ludovichetti Bioteck S.r.l., Arcugnano (VI), Italia

Correspondencia a: Stefano Pagnutti

E-mail: stefano.pagnutti@tele2.it

Palabras clave: injerto óseo, desantigenización enzimática, osteopromotores

RESUMEN

Los diferentes biomateriales para injerto óseo que se comercializan actualmente son sintéticos o naturales. Entre aquellos naturales, los biomateriales derivados de hueso de mamífero son muy interesantes, porque su estructura, su composición química y morfología de la parte mineral del hueso de las diferentes especies de mamíferos es muy similar y, algunas veces, idéntica. Sin embargo, el proceso de desantigenización utilizado para eliminar del tejido del hueso heterólogo la parte orgánica antigénica puede alterar la cinética del proceso de remodelación osteoclástica de la parte mineral. Esto es lo que sucede cuando se aplica el proceso común con altas temperaturas: el producto final es casi no reabsorbible.

Para superar tales limitaciones, fue ideado un método de desantigenización por vía enzimática. Dicho método se basa sobre la aplicación de una mezcla de enzimas que actúan a 37°C, y no alteran las propiedades de remodelación del componente mineral del hueso, tal como lo demuestran los estudios histomorfométricos. Asimismo, la reciente evolución y perfeccionamiento del proceso enzimático, permitieron desarrollar una nueva clase de matrices de hueso desmineralizado de animal que demuestra propiedades osteopromotoras prometedoras para la estimulación de la regeneración ósea.

Introducción

Los desarrollos recientes en la rehabilitación protésica en Ortopedia e implantología osteointegrada en Odontología aumentaron la necesidad y la frecuencia de la cirugía con regeneración ósea guiada (GBR).

Las cirugías GBR se basan sobre el injerto de un biomaterial en la zona a elevar, cubriendo el injerto con una membrana GBR. La finalidad principal del biomaterial es proporcionar un soporte mecánico a los vasos sanguíneos y células que colonizarán el sitio del injerto. Dicho efecto mecánico es conocido como *efecto andamio*, o efecto *osteoconductor*, y es necesario para lograr la regeneración ósea. La membrana GBR se coloca sobre el sitio del injerto para prevenir que las células epiteliales y conectivas, cuyo índice mitótico es más rápido que el proceso de regeneración ósea, invadan el sitio del injerto. Si esto sucediera, la regeneración ósea fracasaría porque el espacio sería llenado con tejido conectivo fibroso.

En lo referente a los materiales para injerto, según la literatura actual, el hueso autólogo es considerado el *patrón oro*.

Las razones son: a) el hueso autólogo es, sin dudas, biocompatible totalmente;

b) produce un excelente efecto osteoconductor pero también c) ya contiene células diferenciadas que producen tejido óseo (esto se denomina efecto *osteogénico*) y d) contiene varios factores de crecimiento diferentes que pueden estimular la regeneración ósea (esto se denomina el efecto *osteoinductor*).

Sin embargo, el uso de hueso autólogo no está exento de riesgos. Es necesaria una segunda cirugía para su extracción, y esto supone un aumento de los efectos colaterales intraoperatorios y postoperatorios. Incluso en Odontología, si el sitio de extracción es intraoral la cantidad de hueso es pequeña, y no es posible realizar grandes reconstrucciones. Si el sitio de extracción es extraoral (por ejemplo, cresta ilíaca), habrá disponible una mayor cantidad de hueso autólogo, pero los efectos postoperatorios (dolor, etc.) durarán por mucho tiempo. Asimismo, se necesita una sala operatoria adecuada y personal, lo que aumenta los costes.

Para evitar la utilización de hueso autólogo y los riesgos consiguientes, se han propuesto diferentes biomateriales osteoconductores, tanto naturales como sintéticos, como alternativa para el uso clínico. Sin embargo, un análisis detallado de sus propiedades muestra que sus índices de reabsorción (algunas veces a causa de la actividad osteoclástica, otras por la digestión enzimática o acción macrófaga) están lejos de ser fisiológicos (7, 13, 14).

Sin embargo, el índice de reabsorción del biomaterial es un elemento clave en la regeneración ósea. Por ejemplo, si un biomaterial es reabsorbido a una velocidad más veloz de aquella de formación del hueso nuevo, una parte del sitio del injerto no se llenará con hueso nuevo. En tal caso el éxito de la regeneración será sólo parcial. Por el contrario, si la reabsorción es muy lenta (años) o inexistente, el sitio del injerto estará permanentemente o casi permanentemente relleno con una mezcla de biomaterial y hueso endógeno. En lo referente a la Odontología, desde un punto de vista teórico, este factor puede tener consecuencias negativas sobre las propiedades mecánicas del hueso regenerado y su capacidad para soportar los implantes (5). En Ortopedia, es obvio que el resultado clínico puede ser aceptado sólo para reconstrucciones pequeñas, que no soporten peso.

La necesidad de lograr una reabsorción “correcta” atrajo la atención hacia los biomateriales derivados de hueso de mamífero. La composición química y la morfología de la parte mineral del hueso de mamífero son muy similares en todos los mamíferos, incluido el hombre. La similitud es tal que el componente óseo mineral de una especie puede ser reconocido como endógeno y remodelado por los osteoclastos que pertenecen a un individuo de otra especie (12).

De todas maneras, antes del injerto, el hueso obtenido de un mamífero de especie no humana debe ser desantigenizado para evitar la reacción del sistema inmunitario del anfitrión.

Un modo sencillo de eliminar el componente antigénico del hueso de mamífero es utilizar un tratamiento a alta temperatura (> 500°C). Dichas temperaturas son tan altas que eliminan totalmente el componente orgánico del hueso (proteínas, lípidos, azúcares) que son responsables de la respuesta inmunitaria. Este método fue aplicado durante muchos años para obtener el biomaterial más común (Bio-Oss, Geistlich, Suiza – de hueso bovino) utilizado en Odontología. Este tipo de tratamiento tiene la ventaja obvia de ser muy fácil de aplicar. Pero, lamentablemente, demostró que produce una disminución radical del porcentaje de remodelación osteoclástica del producto final, probablemente a causa de una modificación física de la estructura del apatito óseo causada por el calor (11).

A fin de superar los límites del método térmico se desarrolló un método alternativo de desantigenización, basado sobre la utilización de enzimas digestivas, que describimos brevemente en este trabajo. Este método permite obtener la remodelación ósea fisiológica del material de injerto.

Asimismo, se describirá una variedad del mismo método de desantigenización que permite obtener productos estimuladores (“osteopromotores”). El principio de esta aplicación se basa sobre dos observaciones. La primera es que el colágeno óseo tipo I en el que se depositan las sales minerales, contiene algunos factores de crecimiento. Esta propiedad fue descubierta observando que la *matriz ósea desmineralizada* (DBM) puede estimular la producción de tejido óseo nuevo (9), incluso cuando es injertado en tejidos ectópicos. Dicho efecto depende de los factores de crecimiento insitos en la matriz de colágeno ósea, tal como IGF II, TGF-beta, IGF I, PDGF, bFGF, BMPs y otros (9). El segundo hecho es que estas proteínas son conservadas entre las diferentes especies de mamíferos (6). La homología de la secuencia aminoácida (el porcentaje de aminoácidos idénticos) es tan alto – si no completo– que el *DBM de una especie es estimulada incluso cuando se la injerta en un individuo de otra especie* (2, 4, 10).

Por lo tanto, la segunda finalidad de este trabajo es describir cómo el método de desantigenización ha permitido alcanzar dos formas de DBM equino que están dando resultados clínicos prometedores.

Materiales y Métodos

Método de desantigenización

Actualmente, el método de desantigenización enzimática está siendo aplicado sobre huesos equinos, no obstante cualquier hueso de mamífero puede ser desantigenizado con este proceso. La elección del hueso de equino se debe a razones comerciales y no biológicas.

Los fémures equinos son recogidos en Italia en mataderos oficiales (en Italia, así como en otros países, la carne equina se utiliza para la alimentación humana), donde los caballos son controlados por los funcionarios Veterinarios oficiales. De esta manera se obtienen huesos de animales sanos, homogéneos en su alimentación y peso.

Los huesos de fémur son limpiados mecánicamente de los residuos y cortados in secciones corticales y esponjosas. Posteriormente, dichas secciones se tratan con un proceso propietario que, utilizando un chorro de vapor, elimina una gran fracción del componente lipídico del hueso.

Las secciones de hueso parcialmente limpiados son tratados con un proceso de desantigenización enzimática. Las piezas de hueso se sumergen en soluciones enzimáticas a base de agua a 37°C. Las soluciones enzimáticas son calibradas escogiendo enzimas cuyos substratos no son sólo familias de compuestos, sino moléculas específicas. Los detalles de la composición de las soluciones no pueden ser dado aquí por razones de secreto industrial.

El proceso de desantigenización para cada hueso dura unos 7 días. Durante este tiempo, las soluciones enzimáticas son renovadas periódicamente y su composición ajustada a los pasos del proceso. Cada paso de la desantigenización está compuesto de tres fases: actividad enzimática – inactivación de enzimas – lavado. Los lavados intermedio y final se hacen con agua osmótica altamente depurada.

La única molécula orgánica que no se elimina de estas secciones es el colágeno óseo tipo I, que forma la trama interna del componente mineral del hueso (Osteoplant, Bioteck, Italia).

Las secciones óseas desantigenizadas son procesadas según el tipo de producto final que se debe preparar. Pueden ser molidos para producir gránulos, o pueden ser conformados para obtener piezas particulares. Las secciones sólidas son adecuadas para la aplicación ortopédica, dado que, por la presencia interior de la red de colágeno, pueden soportar la carga mecánica del peso del paciente.

Otro proceso fue puesto a punto para producir capas de hueso flexibles (Osteoplant Flex, Bioteck, Italia), a través de un tratamiento electrolítico ácido. Dicho proceso no se describe en este trabajo.

Para las aplicaciones dentales, las secciones de hueso también se privan del colágeno óseo a través de un tratamiento húmedo a alta presión (120°C, 7 atm) que permite lograr productos totalmente no colagénicos (Biogen, Bioteck, Italia).

Desantigenización selectiva

El método de desantigenización enzimática también puede aplicarse de manera *selectiva*. Adaptando de manera adecuada la mezcla enzimática es posible escoger qué moléculas serán digeridas preservando, al mismo tiempo, algunas otras. Este proceso puede ser refinado a fin de producir dos compuestos osteopromotores basados en DBM equino: una vez que los bloques de huesos son parcialmente limpiados con chorros de vapor, sufren una desantigenización *selectiva* y son *totalmente* desmineralizados con un tratamiento ácido. El producto final es colágeno óseo tipo I que aún contiene en su interior los factores deseados. A causa de la desantigenización y la esterilización posterior con rayos beta, los factores se rompen en péptidos que conservan, igualmente, la función biológica del factor completo.

Fueron creados dos productos osteopromotores nuevos que se deben aplicar junto con un injerto osteoconductor estándar: un activador de angiogénesis (Osteoplant Angiostad, Bioteck, Italia) y un activador de morfogénesis (Osteoplant Activagen, Bioteck, Italia).

Osteoplant Angiostad es un gel a base de agua que contiene los gránulos DBM. Debe ser aplicado sobre el hueso de los pacientes donde se pondrá el injerto, o mezclado en una proporción de 1:10 de injerto granular. Osteoplant Activagen está hecho con gránulos de colágeno que deben ser mezclados en una proporción 1:1 con gránulos osteoconductores para injerto.

Eficacia de la desantigenización

La eficacia de la desantigenización fue probada directamente. El primer ensayo se basa sobre la medición del contenido lipídico total de acuerdo con el proceso descrito en la norma ISO 1443 (el método consiste en hervir una porción de prueba con ácido hidroc্লórico para liberar las fracciones de lípidos enlazadas y ocluidas, filtración de la masa resultante, secado y extracción con n-hexano o petróleo ligero, de la grasa retenida en el filtro, la que se pesa).

También se realizó un examen visual directo con un Microscopio electrónico de barrido (SEM) sobre bloques de hueso desantigenizados similares, para medir la dimensión de la porosidad en el hueso equino. Por último, los bloques desantigenizados se cortaron en secciones finas que se analizaron tras la coloración con hematoxilina-eosina (la muestra se descalcificó con un descalcificador que contiene EDTA y fue incluida en parafina. La misma muestra se cortó en secciones de 6-7 micras coloreadas con hematoxilina-eosina y observadas en el microscopio óptico).

Propiedades de remodelación osteoclásticas

Las propiedades de remodelación osteoclásticas fueron medidas con análisis histológicos después de la cirugía dental. Cuando la altura o el espesor del hueso no son suficientes para colocar los implantes dentales, se hace un injerto y los implantes se introducen en una segunda cirugía, algunos meses más tarde. Entonces, se puede tomar una muestra de hueso y colorearla con hematoxilina-eosina tal como descrito en el punto anterior. Esa prueba puede mostrar si el sustituto óseo se ha remodelado y la cantidad residual de injerto. Todos los resultados presentados en este trabajo se refieren a cirugías de elevación del seno maxilar hechas con gránulos óseos corticoesponjosos, no colagénicos, tratados con enzimas (Biogen Mix – Bioteck – Italia).

Efecto Osteopromotor

El efecto osteopromotor se evaluó tanto con pruebas *in vitro* como con estudios clínicos. Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo con células endoteliales humanas cultivadas (para el activador de la angiogénesis) y sobre osteoblastos humanos (para el activador de la morfogénesis). Las células endoteliales se utilizaron para medir a) si el activador de la angiogénesis era capaz de inducir la proliferación celular y b) si el activador de la angiogénesis era capaz de inducir la migración celular. Los osteoblastos se utilizaron para evaluar si el activador de morfogénesis afectaba su índice mitótico y la actividad de su fosfatasa alcalina (el marcador de su actividad osteogénica).

El estudio del efecto osteopromotor a través de estudios clínicos se hizo con exámenes histológicos como antes descrito.

Resultados y Discusión

Eficacia de la desantigenización

a) Contenido lipídico total

El contenido lipídico total medido de acuerdo con la norma ISO 1443 es nulo (<0.01 g por cada 100 g de muestra – no detectable según la misma norma).

b) Análisis SEM

La porosidad de las muestras analizadas es superior a $100 \mu\text{m}$, que el límite menor de diámetro de los poros para obtener una correcta vascularización. La medida de los poros está comprendida entre 435 ± 58 a $750 \pm 80 \mu\text{m}$ (1).

c) Análisis histológico de muestras desantigenizadas

Las muestras son totalmente desantigenizadas. El proceso de desantigenización también eliminó los osteocitos (las lagunas de osteocitos están vacías).

(Fig. 1a y Fig. 1b).

Fig. 1. a) Hueso equino tratado con proceso de desantigenización enzimática total. Coloración Hematoxilina-eosina. No se observa ningún residuo celular.
b) Un detalle ampliado

Propiedades de remodelación osteoclásticas

Los análisis histológicos en los pacientes que fueron sometidos a cirugía de elevación del seno maxilar demuestran que el biomaterial procesado con enzimas alcanzó una remodelación osteoclástica total después de 12 meses (Fig. 2). El mismo resultado se logró en 6 meses cuando el injerto óseo se mezcló previamente con una mezcla de hueso autólogo (1:1) (Fig. 3). Tales resultados relativos al granulado no colagénico confirman los análisis histológicos hechos en los bloques de hueso tratados por vía enzimática (3).

Efecto Osteopromotor

El activador de angiogénesis fue capaz de inducir la proliferación y la migración de células endoteliales humanas cuando se lo comparó para el control; el activador de morfogénesis indujo un aumento significativo del índice mitótico de los osteoblastos y de la actividad de la fosfatasa alcalina. Tales resultados están en imprenta actualmente. Añadiendo compuestos osteopromotores al granulado de hueso, en las cirugías de elevación del seno maxilar, se lograron, seis meses después del injerto, resultados similares a los observados cuando se utilizó la mezcla de injerto y hueso autólogo (Fig. 4).

Fig. 2. Muestra de hueso tomada 12 meses después del injerto con material óseo de origen equino, tratado con enzimas, no colagénico. Coloración Hematoxilina-eosina. El material se remodeló completamente

Fig. 3. Muestra de hueso tomada 6 meses después del injerto con una mezcla 1:1 de material óseo de origen equino, tratado con enzimas, no colagénico y hueso autólogo. Coloración Hematoxilina-eosina. La remodelación es completa

Todos estos resultados muestran que es posible aplicar un método de desantigenización enzimática para que el hueso de mamífero sea totalmente biocompatible para las cirugías GBR, cuando se debe hacer un injerto óseo. Dicho método permite lograr una desantigenización completa haciendo que la parte mineral del hueso de mamífero de diferentes especies sea totalmente compatible y adecuada para injertos en seres humanos.

Además de la desantigenización total, otra ventaja de este método es que no son alterados los índices de remodelación osteoclástica del componente mineral óseo. Por lo tanto, una vez que se injerta el hueso de mamífero tratado por vía enzimática, este responde fisiológicamente al entorno biológico, y es remodelado según el índice de remodelación de la zona del injerto. Este hecho es muy interesante desde el punto de vista clínico, porque tales materiales permiten obtener, como resultado del proceso de regeneración, sólo hueso endógeno. Estos resultados ya fueron publicados en la literatura como informe de caso (3). La *restitutio ad integrum* es completa, y el hueso regenerado puede responder fisiológicamente a toda la estimulación posterior (carga mecánica de implantes en odontología, carga mecánica del peso del cuerpo en injertos grandes en ortopedia).

Fig. 4. Muestra de hueso tomada 6 meses después del injerto con una mezcla de material óseo de origen equino, tratado con enzimas, no colagénico, un activador de angiogénesis y un activador de morfogénesis. Coloración Hematoxilina-eosina. La remodelación es completa

Por último, tales resultados demuestran que el método de desantigenización enzimática puede ser adaptado para lograr preparaciones estimulantes basadas en la aplicación de DBM animal. Estos resultados están siendo sometidos a un minucioso estudio, no obstante los primeros resultados ya hayan sido publicados (8). Si dicho estudio confirmará los datos prometedores observados, estos preparados osteopromotores serán muy útiles en la práctica clínica, porque minimizarán la extracción de hueso autólogo con todas sus desventajas. Asimismo, la ventaja de aplicar estos productos será doble: por una parte se acelerarán los tiempos de regeneración de la zona del injerto, pero, lo más importante, es que aumentarán la cantidad de éxitos cuando se encuentren situaciones anatómicas difíciles.

Conclusiones

En este documento presentamos un proceso nuevo, basado sobre la aplicación de enzimas que fue desarrollado para lograr que la parte mineral del hueso de mamífero sea biocompatible y adecuada para su injerto en seres humanos. El método ha demostrado que permite la desantigenización total y, más importante aún, que preserva la cinética fisiológica de la remodelación osteoclástica. La importancia clínica de tal característica ya ha sido discutida. Asimismo, un

perfeccionamiento del mismo método permite lograr preparados con una propiedad osteoconductora ligera, denominada "osteopromotor", que puede ser un avance prometedor en la cirugía de regeneración ósea.

REFERENCIAS

1. **Bedini R, Ioppolo P, Pecci R, Filippini P, Caiazza S, Bianco A, Columbro G.** (2005) Rapporto Istituto superiore di Sanità (Italian Health Superior Institute Report 05, 37)
2. **Chesmel K.D., Branger J., Wertheim H., Scarborough N.** (1998) *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **56**(7), 857-865.
3. **De Biase A., Guerra F., Cipriano L., Lamazza L., Tucci E.** (2005) *Minerva Stomatol.*, **54**(1-2), 99-108.
4. **Guizzardi S., Di Silvestre M., Scandroglio R., Ruggeri A., Savini R.** (1992) *Spine*, **17**(6), 701-707.
5. **Hallman M, Cederlund A, Lindskog S, Lundgren S, Sennerby L.** (2001) *Clin. Oral Implants Res.*, **12**, 135-143.
6. **Jaw R., Seid C., and Wironen, J.** (2001) *Society For Biomaterials Transactions*, p. 154.
7. **Koo K.T., Polimeni G., Qahash M., Kim C.K., Wikesjo U.M.** (2005) *J. Clin. Periodontol.*, **32**(1), 104-110.
8. **Ludovichetti M., Pagnutti S., Pennelli N.** (2007) *Quintessenza Internazionale*, **23**, 7-13.
9. **Pacaccio D.J., Stern S.F.** (2005) *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, **22**(4), 599-606.
10. **Rafael M.S., Laize V., Cancela M.L.** (2006) *Bone*, **15**.
11. **Sartori S., Silvestri M., Forni F., Icaro Cornaglia A., Tesi P., Cattaneo V.** (2003) *Clin. Oral Implants Res.*, **14**(3), 369-372.
12. **Weiner S., Wagner H.D.** (1998) *Annual Review of Materials Science*, **28**, 271-298.
13. **Wilson T., Parikka V., Holmbom J., Ylanen H., Penttinen R.** (2006) *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **77**(1), 67-74.
14. **Zaffe D., Leghissa G.C., Pradelli J., Botticelli A.R.** (2005) *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **16**(9), 789-793.