

# DESARROLLO DE UNA BIO CERÁMICA BIOMIMÉTICA PARA USO ESPECÍFICO EN ODONTOLOGÍA

por

Claudia I. Guevara<sup>1</sup>, Gloria Romero de Pérez<sup>2</sup>, Martha L. Calle<sup>3</sup> & Edgar Delgado<sup>4\*</sup>

## Resumen

**Guevara C.I., G. Romero, M. Calle & E. Delgado:** Desarrollo de una biocerámica biomimética para uso específico en odontología. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **30** (117): 595-604, 2006. ISSN 0370-3908.

Los tejidos naturales duros como hueso, esmalte y dentina son tejidos calcificados además de algunos componentes orgánicos. El diente tiene un alto porcentaje de tejido mineral, conformado básicamente por fosfatos de calcio como la hidroxiapatita. En este artículo se describe el diseño y aplicación de dos biocerámicas fosfoalcalinas, biomiméticas, sintetizadas a partir de la cáscara de huevo, por el grupo GRAMO. Estas fueron colocadas en molares de ratas *Wistar*, como fase preliminar en el desarrollo de un nuevo material para uso sobre humanos. En los premolares se observó el comportamiento biológico tanto en respuesta aguda como en respuesta crónica.

**Palabras clave:** Biocerámicas, fosfatos de calcio, pulpa dental, biomimético.

## Abstract

Natural hard tissues such as bone, enamel and dentine are calcified tissues accompanied by some organic components. Tooth has a high percentage of mineral tissue, basically consisting of calcium phosphates like hydroxyapatite. In this article the design and application of two bioceramics consisting of various calcium phosphates is described. Calcium phosphates phases were synthesized from eggshells. Some physicochemical properties were taken into account to produce a balanced blend of biomimetic phosphates. Two of these mixtures were applied in *Wistar* rats premolars. The biological acute and chronic pulpar response was evaluated. This preliminary assessment indicates the feasibility of pursuing further studies on these composite materials for human use.

**Key words:** Bioceramics, calcium phosphates, dental pulp, biomimetic.

---

Grupo Aplicación de Materiales a la Odontología (GRAMO).

1 Departamento de Química.

2 Laboratorio de Microscopía.

3 Facultad de Odontología.

4 Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

\* Correo electrónico: edelgadam@unal.edu.co Avenida Carrera 30 #45-03, Bogotá. Fax +57 1 3165220.

## Introducción

Los tejidos calcificados (hueso, dentina y esmalte) están constituidos de una parte orgánica y una mineral. El contenido mineral alcanza el 70% en la dentina y 96% en el esmalte dental (**Pashley D, Walton R.** 1997). El mineral es hidroxiapatita (HA) no estequiométrica con sustituciones de  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ , F y vacancias. La composición química, la morfología cristalina y la distribución de cristales de las apatitas biológicas varían según las especies, los tejidos y la edad de los individuos (**Doremus RH,** 1992; **LeGeros RZ,** 1991).

En tejidos duros, las biocerámicas podrían ser los biomateriales de sustitución ideales, ya que poseen una buena biocompatibilidad e integración con estos tejidos y, a su vez, son los materiales más parecidos al componente mineral humano (Tabla 1).

### Las biocerámicas

Las cerámicas pueden ser naturales como el cuarzo, la piedra imán, el topacio, el corindón y las piedras preciosas. Pueden ser sintéticas como la alúmina, en especial las de alta pureza, las ferritas de los medios magnéticos de almacenamiento de datos, el carburo de silicio de las lijas, los transistores, los aislantes eléctricos, los superconductores, el combustible nuclear y muchísimos más.

De manera general la cerámica puede definirse como todo material inorgánico, no metálico, con enlaces iónicos o iónico-covalentes (la mayoría de materiales cerámicos son óxidos), conformado a partir de un polvo en el que la consolidación se hace con sinterización. Entre estas cerámicas existen las biocerámicas o biomateriales cerámicos y entre estas biocerámicas las más utilizadas son los compuestos de fosfato y calcio o compuestos fosfocálcicos.

Entre los compuestos fosfocálcicos se encuentra una gama muy variada de biocerámicas en donde las más biomiméticas son los fosfatos que provienen del ácido ortofosfórico. Entre estos ortofosfatos encontramos la hidroxiapatita  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , el fosfato tricálcico beta  $Ca_3(PO_4)_2$ , el fosfato monocálcico monohidratado  $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ , el fosfato octacálcico  $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$ , el fosfato dicálcico dihidratado  $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ , el fosfato monocálcico anhidro  $Ca(H_2PO_4)_2$ , el fosfato tetracálcico  $Ca_4(PO_4)_2O$ , la carboapatita  $Ca_{10}(PO_4)_3(CO_3)_3(OH)_2$ , el fosfato dicálcico anhidro  $CaHPO_4$  y el fosfato de calcio amorfo. La mayoría de estos se encuentran en tejidos naturales en condiciones naturales o patológicas (**Mathai M, Ahozo T.** 2001).

Las cerámicas mono o dicálcicas son muy ácidas y en la actualidad tienen aplicaciones restringidas principalmente a los biocementos y a otras pocas aplicaciones. Las características esenciales de estas cerámicas, especialmente las menos ácidas, son la biocompatibilidad y la bioactividad. La biocompatibilidad inerte puede describirse como ausencia de toxicidad, de inflamación y de generación de respuesta a cuerpo extraño. La bioactividad se define como ausencia de toxicidad, ausencia de inflamación con interacción constructiva con las células y tejidos vivientes circundantes.

Los fosfatos cálcicos, especialmente los sinterizados o los obtenidos por sinterización reactiva, son materiales cerámicos. La apatita es un material cerámico natural que se encuentra en yacimientos geológicos frecuentemente como fluoroapatita. Estos mismos dos minerales a su vez se encuentran en sistemas vivos donde hacen parte del metabolismo de varios iones, principalmente del calcio que se almacena en fase sólida y proporciona soporte

**Tabla 1.** Comparación de la composición inorgánica de tejidos calcificados con un material cerámico (**Dorozhikin SV, Epple M.** 2002).

Composición	Esmalte	Dentina	Hueso	Hidroxiapatita
Calcio [wt%]	36,5	35,1	34,8	39,6
Fósforo (P) [wt%]	17,7	16,9	15,2	18,5
Ca/P (relación molar)	1,63	1,61	1,71	1,67
Sodio [wt%]	0,5	0,6	0,9	-
Magnesio [wt%]	0,44	1,23	0,72	-
Potasio [wt%]	0,08	0,05	0,03	-
Carbonato ( $CO_3^{2-}$ ) [wt%]	3,5	5,6	7,4	-

mecánico y funcionalidad como instrumento de defensa y masticación para la digestión. Una biocerámica puede ser una cerámica natural como las constituyentes de tejidos duros pero también abarca las cerámicas sintéticas que tienen aplicaciones médicas y odontológicas.

La palabra biomimético designa los procesos o los materiales que se han obtenido imitando las condiciones de proceso o las características finales de los materiales naturales de los seres vivos. El esmalte dental que es hidroxiapatita en un alto porcentaje debe su dureza a una sinterización biológica lenta pero muy eficiente que se lleva a cabo a temperatura corporal.

La apatita que el hombre produce artificialmente no tiene la maravillosa microestructura de la natural y la endurecemos en poco tiempo por sinterización a temperaturas cercanas a los 1000°C. Esta temperatura definitivamente no es biomimética. Las propiedades mecánicas de la HA policristalina artificial son pobres comparadas con las de la HA natural o sea la perfectamente biomimética.

#### **Bio-Remineralización dental en recubrimiento pulpar directo**

La biomineralización es la elaboración de una matriz orgánica seguida de una nucleación heterogénea ionotrópica de sales de calcio a partir de una solución acuosa para formar un tejido duro. La mineralización es un proceso complejo en donde intervienen diferentes tejidos y células, factores de origen celular, moléculas y especies químicas que participan en reacciones químicas asociadas con las células. La primera etapa del proceso de mineralización es la sobresaturación de iones de calcio y fosfato en el medio. Esta condición no es suficiente para la mineralización, ya que no es sólo un fenómeno físico-químico, también los factores biológicos intervienen. El paso de estado líquido a estado sólido se llama nucleación, es decir, formación del primer núcleo sólido a partir de iones individuales. Para formar un núcleo estable, los iones se tienen que ordenar de forma apropiada. Si el tamaño del núcleo en la solución es estable y suficiente, se puede generar crecimiento cristalino y la formación de un primer cristal (**Posner AS**, 1985).

El tejido vivo de los dientes o sea la pulpa puede quedar expuesta por causas traumáticas, de caries o clínicas y frecuentemente muere conllevando a tratamiento de conductos, muerte pulpar y pérdida del diente. Sin tratamiento las consecuencias pueden ser inflamaciones, infecciones, encefalitis, meningitis y muerte.

El recubrimiento pulpar es la colocación de un material para cubrir y proteger la pulpa, evitar su muerte y

permitir la cicatrización de la pulpa por medio de un proceso de bio-remineralización. El recubrimiento, entre otros beneficios, protege el diente e induce el cierre del extremo apical de la raíz dental. El producto más utilizado para este recubrimiento es el hidróxido de calcio además de algunas cerámicas biocompatibles o también de polímeros. El recubrimiento pulpar tiene varios propósitos, el primero es proteger la pulpa de la agresión continuada y agravante, el segundo es el mantenimiento de la vitalidad del diente tratado. La protección de la pulpa vital busca llevar, en un tiempo prolongado, a la regeneración de la dentina por la producción que realiza la pulpa viva de un tipo de dentina llamada terciaria para reemplazar la dentina primaria o secundaria que se destruyó debido a diferentes causas. Este proceso de regeneración por bioremineralización lo realizan células especializadas llamadas odontoblastos

Se ha demostrado que la utilización de hidroxiapatita pura en ratas, algunas veces, genera una reacción inflamatoria y una necrosis superficial en el tejido de la pulpa dental. El fosfato tricálcico ha demostrado dar buenos resultados y se ha observado neoformación de dentina alrededor de los gránulos de cerámica, mostrando ser superior al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en algunas oportunidades (**Merray PE et al.** 2002).

Se han utilizado otros materiales para este fin, como resinas compuestas, adhesivos, ionómeros, etc. (**Elledge DA.** 1998, **Jean A et al** 1988) y se ha demostrado que las cerámicas, más que otros materiales, tienen una buena biocompatibilidad y una posible acción de regeneración tisular.

La integración entre el material cerámico y el tejido tiene 3 fases: la primera es una reabsorción, la segunda es la interposición de capas de tejido fibroso que a su vez se da en varias etapas: se generará una inflamación, y luego vendrán al lugar células osteogénicas especializadas que son controladas por varios factores y en la tercera fase vendrá una mineralización en donde se sabe que existe una transformación de odontoblastos a odontoblastoides que son los que posteriormente secretan la matriz para mineralización que se reboseará de iones de calcio y fosfato generando finalmente los cristales de hidroxiapatita (**Ten Cate A.R.** 1989).

Este artículo muestra el proceso de diseño e implementación de materiales biomiméticos cerámicos según sus propiedades fisicoquímicas, con el fin de compararlas con las del hidróxido de calcio, para obtener una cerámica compuesta que supere el desempeño de éste último. Al mismo tiempo, se quiere mostrar un estudio preliminar en

donde se utilizaron dos cerámicas biomiméticas no estequiométricas (llamadas QCP1 y QCP2), sintetizadas a partir de cáscara de huevo en el Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Las dos cerámicas utilizadas están compuestas por fosfato tricálcico (TCP), hidroxiapatita (HA) sinterizada y HA no sinterizada unida a otros compuestos o elementos químicos tales como carbonatos, potasio, sodio, cloro y magnesio, entre otros combinados en diferentes proporciones para dar origen a los dos materiales cerámicos antes mencionados y determinar su capacidad de interacción con el tejido vivo, para una posible regeneración dentinal en recubrimientos pulpares directos usando normas internacionales (**American Dental Association**, 1972,1979, **Norma ISO 7405**, 1997).

## Metodología

### Selección de materiales

El primer factor que se tuvo en cuenta fue la composición química de la o las fases que se van a emplear. Para que los resultados sean más cercanos a los de los materiales naturales se debe buscar que la composición química sea lo más biomimética posible por lo que se analizó la composición reportada en literatura para esmalte y dentina y se seleccionaron tanto un material de partida para la síntesis como un proceso biomimético.

Aunque los huesos tienen composición muy parecida a la de los otros tejidos duros como la dentina, se decidió no emplearlo debido a que por las propiedades de intercambiador iónico de la HA, en el material óseo se acumulan los iones benéficos y además los metales pesados con consecuencias negativas en el funcionamiento de los materiales implantados. Se seleccionó un material de desecho con constitución iónica muy parecida a la de la dentina que es la cáscara de huevo de gallina ya que consta en su parte inorgánica casi totalmente de carbonato de calcio (98%) y el 2% restante es carbonato de magnesio y pequeñas cantidades de iones sodio, potasio y fosfato. La composición global de los tejidos duros también se puede obtener por mezcla de compuestos puros que contengan los iones mencionados en cantidades apropiadas pero esto conlleva complejidad al requerir un número de reactivos analíticos que contengan como iones mayoritarios los recién mencionados y que no contengan elementos pesados o extraños a los organismos vivos. Así que como material de partida se empleó la cáscara de huevo. Los análisis de fluorescencia de rayos X, de difracción de rayos X, de análisis térmico diferencial, termogravimétrico e infrarrojo de la cáscara justifican ampliamente esta selección.

### Selección de la fuente de calcio y del proceso

Para llegar a materiales más biomiméticos es preciso que el tratamiento químico no dañe el balance de iones del material de partida. Se decidió emplear como vía de síntesis la reacción ácido base heterogénea (líquido-sólido) debido a que además de las fases cerámicas de fosfatos de calcio el único subproducto es agua y esto favorece la alta biocompatibilidad. Esta vía empieza por la descomposición térmica de la cáscara de huevo a 1000°C, temperatura que asegura la eliminación de toda materia orgánica de la cáscara que podría generar respuesta inmunológica a los implantes. Además el carbonato se descompone completamente para dar CaO. Este se hace reaccionar con exceso de agua desmineralizada para obtener el hidróxido. Este se suspende en agua y se hace reaccionar con solución acuosa de ácido ortofosfórico para obtener el fosfato de calcio deseado. Por tratarse de un sistema heterogéneo la reacción no se completa a pesar de tiempos de reacción prolongados y agitación fuerte y permanente. Para favorecer la biomimeticidad se sustituyó en todo el proceso el agua por suero biológico artificial (SBA) que contiene los iones inorgánicos más abundantes en concentraciones iguales a las del suero sanguíneo humano de forma tal que el proceso no drene los iones originales de la cáscara si no que los mantiene y puede incorporar a los sólidos nuevos iones en concentraciones biológicas.

### Selección de las fases

El material cerámico biocompatible por excelencia para tejidos duros comprobado en estudios clínicos es la HA. Esta se obtiene en la síntesis descrita anteriormente en forma nativa y la usada en implantes es la HA sinterizada a temperaturas que varían entre 900 y 1200°C según algunas propiedades de los polvos antes de sinterizarlos. Las cerámicas sinterizadas son muy poco porosas, densas y tienen baja solubilidad. Como la remineralización la efectúan células que no se desplazan por los fluidos biológicos si no que lo hacen por superficies sólidas, es conveniente aportar un material como la HA sinterizada que ofrezca soporte físico estable, cosa que se logra bien pues la HA sinterizada tiene una solubilidad bastante pequeña ( $-\log K_{sp} = 116,8$  (**Dorozhikin SV, Epple M.** 2002) que la hace muy poco resorbible y tiende a ser más un material biocompatible inerte que un material biocompatible activo (Tabla 2). Así que se decidió que esta HA debía ser un componente del material a ensayar.

Sin embargo, los odontoblastos para poder crear neodentina requieren de calcio y fósforo en solución que otras células existentes en la pulpa pueden disolver con

**Tabla 2.** Propiedades relevantes de algunos fosfatos de calcio (Dorozhikin SV, Epple M. 2002).

[a] No precipitan en solución a ningún pH y se deben obtener en fase sólida.

Componente	Fórmula	Solubilidad a 25°C - log(K <sub>sp</sub> )	Solubilidad a 37°C - log(K <sub>sp</sub> )	pH: estabilidad en solución acuosa a 25°C
Brushita, fosfato dicálcico dihidratado	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,59	6,63	2,0-6,0
Fosfato octacálcico	Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	96,6	95,9	5,5-7,0
α-fosfato tricálcico	α-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	25,5	25,5	[a]
β-fosfato tricálcico	β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	28,9	29,5	[a]
Hidroxiapatita	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	116,8	117,2	9,5-12

flujo muy pequeño desde tejidos duros (Guevara CI, Delgado E. 2006). También en la irrigación sanguínea hay concentraciones de ambos elementos en bajas concentraciones. Por lo anterior parece necesario aumentar las concentraciones de calcio y fósforo disponibles en el sitio del implante para que se de una remineralización acelerada. Esto se implementó de dos formas, la primera con la incorporación de HA no sinterizada que tiene una solubilidad mayor que no corresponde a la del material cristalino. Este suministro de iones será un poco más elevado que el natural y estable por largo tiempo. Cabe anotar que las HA sintetizadas en laboratorio para este material compuesto fueron HAs no estequiométricas debido no solamente a las vacancias frecuentes en este material si no también a la existencia de cationes mono y bivalentes así como a sustitución de carbonato tipo A y o B que desvían la relación Ca/P del valor de 1,67.

Para lograr un aporte de iones calcio y fósforo de mayor concentración es necesario recurrir a otras fases de entre las que se seleccionó el fosfato tricálcico beta con estructura de whitlockita debido a la estabilidad conferida por la pequeña cantidad de magnesio proveniente de la cáscara y del SBA del proceso. Esta cerámica tiene un  $-\log K_{sp} = 25,5$  (Dorozhikin SV, Epple M. 2002) que indica el papel de aporte incrementado de los iones mineralizantes.

Los tejidos de restauración inducidos por implantes de HA de alta pureza son diferentes a los tejidos naturales porque estos se han formado en un ambiente que contiene CO<sub>2</sub> de la respiración y carbonatos y la HA es capaz de intercambiar iones, entre ellos el ión carbonato en dos posiciones estructurales llamadas A y B. La A solamente sucede cuando el carbonato se incorpora durante la formación de la cerámica pues estos sitios son estructurales inamovibles y cuando la exposición es tardía el intercambio ya es imposible. La sustitución B se puede dar durante o des-

pues de la formación. Así que la HA natural tiene ambas sustituciones y la sintética de alta pureza no tiene ninguna sustitución y en contacto con fluidos biológicos solamente puede tener la sustitución B. Por esta razón durante la síntesis del material biomimético se incorporó el carbonato y además se agregó como una fase cerámica adicional en el material polifásico sintético, para acelerar lo que los histólogos llaman la maduración del tejido neoformado.

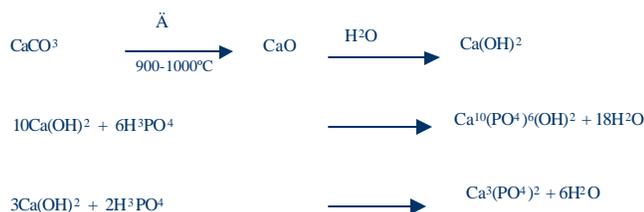
A la luz de lo discutido es más fácil diagnosticar ahora los limitantes que tiene el material tradicionalmente usado en la terapia de recubrimiento pulpar directo o sea el hidróxido de calcio. Este es un material con pH cercano a 13 que lo hace cáustico. Su pH tan básico puede inducir la muerte del tejido pulpar en diente por alta irritabilidad al tejido. Esto explica la disparidad de resultados obtenidos con este hidróxido pues a veces cura a veces necrosa, dependiendo de la salud de la pulpa. Si es saludable aguanta el choque y si está débil la mata. Sin embargo el hidróxido tiene una gran ventaja y es que su pH esteriliza, factor extremadamente importante ya que si se da infección pulpar no hay material mineralizante que sirva y la infección puede tener resultados fatales.

Otra desventaja que se le encuentra al hidróxido es que aporta únicamente calcio y no fósforo. Este problema se resuelve con la selección de las tres fases fosfocálcicas ya mencionadas. El problema del pH también se resuelve en la misma forma ya que las cerámicas son menos alcalinas que el Ca(OH)<sub>2</sub>. Queda el problema de mantener la asepsia para lo cual una opción sería adicionar un antibiótico a la cerámica, cosa que se consideró indeseable y por lo que se recurrió a incluir trazas de hidróxido de calcio en las otras fases cerámicas de forma tal que se mantiene la asepsia del material pero el efecto del pH no es duradero pero si suficiente para que se pueda llevar a cabo la implantación y obturar la restauración.

Para mejorar la homogeneidad del material el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y la HA no se dosificaron aparte si no que se obtuvieron en mezcla íntima por control de las reacciones de síntesis y así se dosificó.

### Producción

Para aplicar los conceptos del diseño del material cerámico polifásico descrito, se sintetizaron los varios componentes cerámicos mencionados, se caracterizaron por técnicas de difracción de rayos X, fluorescencia de rayos X, análisis térmico diferencial, análisis termogravimétrico, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, tamaño de partícula por sedigravimetría de rayos X y análisis químico por vía húmeda de la relación Ca/P. La mezcla de fases se secó, se molió y homogenizó en mortero vibratorio de ágata, se empacó en cantidades de 0.2 g en recipientes herméticos de vidrio grado farmacéutico, se sellaron los recipientes y se esterilizaron con radiación gama. Se prepararon dos composiciones que se bautizaron QCP1 y QCP2 que se diferenciaban en la proporción de las múltiples fases (Díaz CC, 2003).



### Implantación

Las cerámicas QCP1 o QCP2 se implantaron en molares de ratas *Wistar*, al igual que el hidróxido de calcio como material de control, bajo el manejo de bioterio certificado.

Para evaluar su comportamiento biológico sobre la pulpa dental, se establecieron dos grupos de ratas:

Grupo 1: **respuesta aguda**, ratas sacrificadas 3 días después de la implantación de los diferentes materiales.

Grupo 2: **respuesta crónica**, ratas sacrificadas 90 días después de la implantación de los diferentes materiales.

Para este trabajo, se utilizaron quince ratas *Wistar* de 3 meses de edad y de un peso aproximado de 250 gramos.

Se utilizaron diez molares para cada uno de los materiales y cinco para el material control, en cada uno de los grupos (1 y 2). En cada molar se realizó una cavidad oclusal clase I, previa desinfección con peróxido de hidrógeno 3% (vol/vol) y clorhexidina, luego de desinfectado el molar, se hizo una cavidad con fresa de diamante de un cuarto de milímetro de diámetro, hasta llegar a una exposición pulpar mínima, para lo cual se utilizó una lupa. La hemorragia se controló con torundas de algodón estéril. Al limpiar el área, se aplicó una pequeña cantidad (1 mm de espesor, aproximadamente) de hidróxido de calcio o de los materiales QCP1 o QCP2, respectivamente, sobre la exposición. Para implantar el material, previamente, se mezcló el polvo con agua esterilizada hasta formar una pasta espesa aplicable con un bruñidor de bola esférica. Finalmente, se restauró la cavidad con amalgama de plata, como material permanente.

tado el molar, se hizo una cavidad con fresa de diamante de un cuarto de milímetro de diámetro, hasta llegar a una exposición pulpar mínima, para lo cual se utilizó una lupa. La hemorragia se controló con torundas de algodón estéril. Al limpiar el área, se aplicó una pequeña cantidad (1 mm de espesor, aproximadamente) de hidróxido de calcio o de los materiales QCP1 o QCP2, respectivamente, sobre la exposición. Para implantar el material, previamente, se mezcló el polvo con agua esterilizada hasta formar una pasta espesa aplicable con un bruñidor de bola esférica. Finalmente, se restauró la cavidad con amalgama de plata, como material permanente.

Los animales se sacrificaron en dos tiempos quirúrgicos: siete animales a los 3 días y ocho animales a los 3 meses después de colocar el material. se extrajeron los molares que tenían tratamiento con las dos cerámicas y el material de referencia.

Para la respuesta biológica aguda (Grupo 1) se realizaron los siguientes tres análisis:

1. Análisis histopatológico de las muestras, teniendo en cuenta tres niveles así:

Nivel 0, no se encontraron cambios histopatológicos.

Nivel 1, se encontraron cambios histopatológicos moderados.

Nivel 2, se encontraron cambios histopatológicos graves.

2. Análisis radiográfico en la respuesta aguda de los molares Se determinaron cuatro aspectos, así:

0, no hay cambios radiográficos.

1, se presenta un ensanchamiento periapical leve en el molar tratado.

2, se presenta un ensanchamiento periapical grave en el molar tratado.

3, se presentan otros cambios como reabsorciones radiculares internas y externas y calcificaciones intrapulpares.

1. Análisis del comportamiento de los animales.

Los animales del bioterio se observaron continuamente para determinar cambios en el comportamiento que suponen dolor, como pérdida del apetito, inquietud o sueño exagerado.

Para evaluar la respuesta crónica a los materiales, se tomaron dos de las muestras de cada uno de los grupos y

del material control, se prepararon y se llevaron a microscopía óptica. De igual manera, se tomaron otras dos muestras de cada material para llevarlas al microscopio electrónico de barrido; en este último caso, las muestras no sufrieron el proceso de desmineralización.

Se determinaron cuatro parámetros, así:

1. Presencia del puente dentinal,
2. Ausencia del puente dentinal,
3. Presencia de dentina terciaria, y
4. Ausencia de dentina terciaria.

### Resultados y discusión

La caracterización de las cerámicas fue realizada en trabajos anteriores realizados por el grupo de trabajo en donde se confirmó la obtención de hidroxiapatita y fosfato tricálcico (Díaz CC, 2003).

Los materiales que sintetizamos y usamos en este trabajo tienen varias ventajas con respecto al  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ : son más fisiológicos, pues su pH es de 7 a 8, mientras que el del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  es de 12, aproximadamente. Nuestras cerámicas son materiales multifásicos que proveen iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{HPO}_4^-$  de manera pronta y sostenida, lo que permite que se forme un esqueleto en el material con la hidroxiapatita sinterizada, la cual tiene una solubilidad de aproximadamente  $117,2 (-\log K_{sp})$  por otra parte, el  $\beta$ -fosfato tricálcico se va reabsorbiendo permitiendo la entrada de la matriz de colágeno que se va mineralizando.

El  $\beta$ -fosfato tricálcico no se encuentra en sistemas biológicos. Sin embargo, es muy importante y relevante en un proceso de mineralización, ya que éste, después de una saturación inicial de iones calcio y fósforo en el medio, pasa a convertirse en fosfato octacálcico. Posteriormente, se convierte en hidroxiapatita, la cual sufre un proceso de maduración con ayuda de los carbonatos y se convierte, a su vez, en carbonatoapatita: finalmente, se conforman los núcleos de calcificación y terminan en una



**Figura 1.** Ratas Wistar en el momento en que se preparan las diferentes cavidades y se coloca el material. Nótese el espacio reducido para realizar el procedimiento.

matriz mineralizada (Dorozhikin SV, Epple M. 2002, Jean A, 1988).

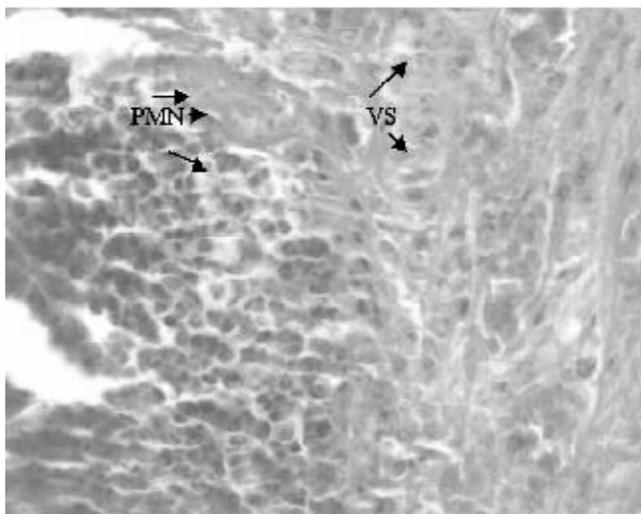
Los resultados de las muestras analizadas en el microscopio óptico se muestran en la Tabla 3. El 75% de los molares implantados con el material QCP1 sufrieron algún grado de inflamación, con presencia de polimorfonucleares neutrófilos y, posiblemente, eosinófilos; mientras que los molares implantados con QCP2 no mostraron inflamación pulpar en ninguno de los molares evaluados, es decir, hubo 100% de biocompatibilidad. Si bien el hidróxido de calcio mostró una buena aceptación por parte de la pulpa, hubo uno, de seis molares, que resultó con inflamación grave.

Tanto en los molares con QCP1 como en aquéllos con hidróxido de calcio, las pulpas inflamadas mostraron una inflamación típica: presencia de polimorfonucleares, aumento de los vasos sanguíneos, desprendimiento de la empalizada odontoblástica y pérdida de la homogeneidad de la matriz colágena (Figuras 2 y 3).

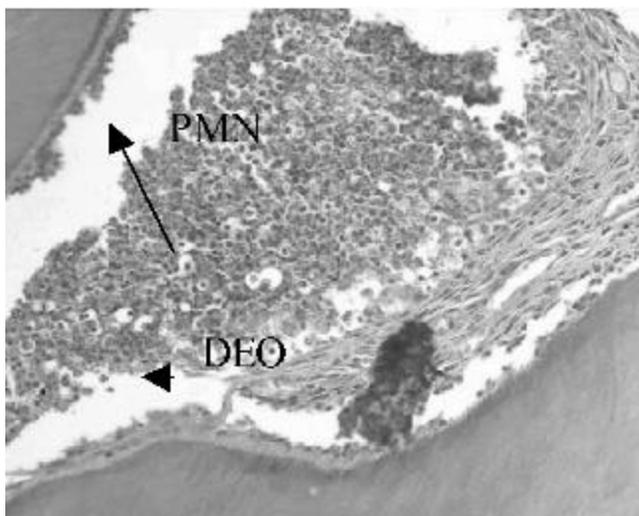
La respuesta positiva del QCP2 se podría explicar por el pH fisiológico y por las propiedades biomiméticas del

**Tabla 3.** Resultados del estudio histopatológico de las muestras, tres días después de la colocación de los diferentes materiales.

Material	Sin cambios histopatológicos	Inflamación pulpar moderada	Inflamación pulpar grave
QCP1	2	5	1
QCP2	9	0	0
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	5	0	1



**Figura 2.** Microscopía óptica del material QCP1. Se observa importante infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), exceso de vasos sanguíneos (VS) y pérdida de la homogeneidad en la matriz de colágeno (MC); (40X).



**Figura 3.** Microscopía óptica del material QCP1. Se observa importante infiltrado de polimorfonucleares neutrofilos (PMN) y desprendimiento de la empalizada odontoblástica (DEO); (20X).

material. Además, podría afirmarse que el uso de carbonatos no es benéfico para la integración del material, ya que este componente era el único que difería entre QCP2 y QCP1, cuyos resultados tuvieron una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,002$ ).

Ahora bien, por la presencia de inflamación pasadas 72 horas, no se puede considerar un hecho la necrosis de la pulpa. Algunos autores afirman que la inflamación posoperatoria puede desaparecer hasta 8 días después de la agresión (Mjör Ivar A. 2002).

El estudio radiográfico presentó una gran concordancia con lo encontrado en el estudio histopatológico. Sin embargo, debe considerarse como un análisis complementario y no de diagnóstico. Los resultados se presentan en la Tabla 4. Se observa que tanto el QCP1 como el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  presentan un importante ensanchamiento periapical y no se encuentran cambios radiográficos en el material QCP2.

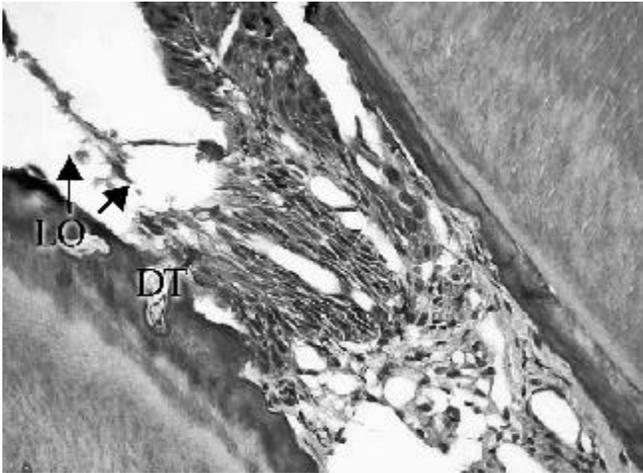
En la respuesta crónica de la pulpa dental con los diferentes materiales sintetizados y el hidróxido de calcio, se quisieron determinar dos aspectos principales: neoformación de dentina terciaria y presencia de puente dental.

Las muestras de QCP1, QCP2 y el hidróxido de calcio presentaron neoformación dentinal con un patrón de crecimiento vertical y no horizontal que es el que permite la formación de puente dental. De igual manera, se pudo observar que el nuevo tejido formado en los tres materiales se caracterizó por ser una osteodentina (dentina en donde hay una formación de lagunas); en ella se observa cómo la matriz mineral se va formando y va encapsulando los odontoblastos (Figura 4), estas observaciones se hicieron tanto en el microscopio óptico como en el electrónico de barrido. Igualmente, en los dientes tratados con QCP1 y en los tratados con QCP2, se puede observar la formación de una matriz densa, inmadura, pero mucho más homogénea que la encontrada con el hidróxido de calcio y que posteriormente se mineraliza.

En el proceso de mineralización de la dentina, existen unas células que juegan un papel muy importante, denominadas células odontoblastoides (*odontoblast-like cells*)

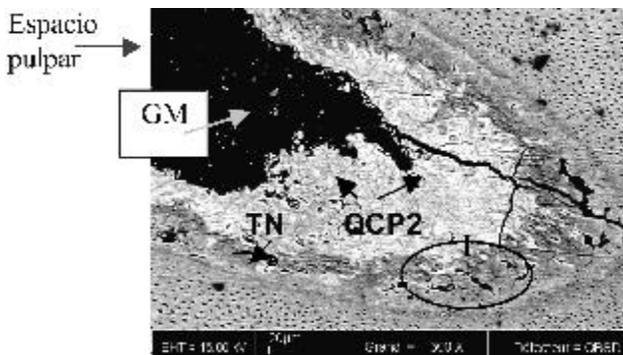
**Tabla 4.** Resultados del estudio radiográfico de las muestras, tres días después de la colocación de los diferentes materiales.

Material	Sin cambios radiográficos	Ensanchamiento periapical leve	Ensanchamiento periapical grave
QCP1	3	5	1
QCP2	7	2	0
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	4	1	1



**Figura 4.** Microscopía óptica del material QCP2. Se observa formación de lagunas de osteodentina (LO) y matriz de posible dentina terciaria (DT); (40X).

que, posiblemente, se diferencian a partir de fibroblastos pulpares y que se convierten en las células que secretan la matriz de mineralización (Mjör Ivar A. 2002, Goldberg M, Smith A. 2004). Estas células se observaron en este trabajo con el material QCP2 (Figura 4). Se ha determinado que estos cambios morfológicos en las células son directamente proporcionales a la capacidad de reparar dentina. Es interesante el hallazgo, observado con microscopía electrónica de barrido, de zonas perfectamente diferenciadas de generación y conducción (orientación) del material de la dentina neoformada, lo que demuestra una verdadera integración (Figura 5).



**Figura 5.** Microscopía electrónica de barrido del material QCP2. Se observan gránulos del material (GM) dentro de la pulpa, dentina terciaria, material QCP2 y una verdadera integración del material (I) y el nuevo tejido formado (TN); (300X).

Todas las muestras observadas tanto en MO como en microscopio electrónico SEM presentaron neoformación dentinal con un patrón de crecimiento vertical y no horizontal que permitiera la formación de un puente dentinal. Se demuestra la generación y conducción del material con la dentina neoformada, y una verdadera integración entre el material, el tejido existente y el nuevo tejido (figura 1).

De manera general podemos decir que la biocerámica QCP2 presentó la mejor biocompatibilidad obteniendo no solamente un 100% de éxito en la evaluación aguda sino adicionalmente presentando una buena homogeneidad y densidad de la dentina terciaria neoformada e inclusive una posible organización de los túbulos dentinales. Igualmente el material QCP2 mostró una verdadera integración con la dentina ya existente. Futuros estudios pueden profundizar en la inocuidad y biocompatibilidad en el material QCP2 cuyos resultados son buenos, siguiendo la normalización de estudios tanto in Vitro como in Vivo para usar en humanos e incluso explorar otras posibles indicaciones como pueden ser: apicoformación o apicogénesis, pulpotomías, resorciones, obturaciones retro y perforaciones dentales entre otras.

Se necesitan estudios complementarios para resolver los problemas presentados en la técnica en cuanto al tamaño de la cavidad, el tiempo esperado para la respuesta crónica, la posible toxicidad del carbonato en este tipo de terapias, la influencia en el porcentaje de las diferentes fases y la importancia que tiene el tamaño de partícula en la respuesta de la pulpa dentaria.

## Conclusiones

Los resultados positivos de regeneración de dentina terciaria incipientemente estructurada como respuesta pulpar a los implantes de cerámicas multifásicas biomiméticas QCP1 y QCP2 diseñadas sobre los principios aquí descritos parecen indicar que los conceptos tenidos en cuenta son decisivos en el buen funcionamiento tanto fisicoquímico como biológico y tisular.

## Agradecimientos

Deseamos agradecer a la DIB – División de Investigaciones de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del proyecto 203004; a la Universidad de Nantes (Francia)- Laboratorio INSERM de Investigación sobre Materiales de Interés Biológico, Ing. Paul Pilet por su ayuda con Microscopía Electrónica y al personal del Bioterio Central de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por la cooperación en este trabajo.

**Bibliografía**

1. **American Dental Association.** 1972. Council on dental materials and devices: recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *J Am Dent Assoc.* **84**: 382.
2. ————— 1979. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *J Am Dent Assoc.* **99**: 697.
3. **Díaz, CC.** 2003. Síntesis de fosfatos de calcio biológicos a partir de cáscara de huevo de gallina. *Tesis de grado.* Dpto. de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C.
4. **Doremus, RH.** 1992. Review bioceramics. *J Mater Sci.* **12**: 285-297.
5. **Dorozhikin SV, Epple M.** 2002. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Ang. Chem. Int.* **41**: 3130-3146.
6. **Elledge DA.** 1998. Multifuncional bases and liners. *Dent Clin North Amer.* **42**(4): 739-754.
7. **Goldberg M, Smith A.** 2004. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.*; **15**(1): 13-27.
8. **Guevara CI, Delgado E.** 2006 Estudio de la Interacción Superficial de un Material Cerámico Multifásico Biomimético con el Tejido Dentino Pulpar. *Tesis de maestría*, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá D.C.
9. **Jarcho M.** 1981 Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop.* **157**: 259-278.
10. **Jean A, Kerebel LM, Kerebel B, Legeros R, Hamel H.** 1988 Effects of various calcium-phosphate biomaterials on reparative dentin bridge formation. *J Endod.* **14**:83-87.
11. **LeGeros RZ.** 1991 Calcium phosphates in oral biology and medicine. En: Myers HM, editor. Monographs in oral science. San Francisco.
12. **Mathai M, Ahozo T** 2001. Structures of biological minerals in dental research. *J Res Natl Inst Stand Technol*; **106**: 1035-1044.
13. **Mjör Ivar A.** 2002 Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. *Quintessence Int.* **33**: 113-135.
14. **Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW.** 2002. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping and future therapies. *Crit. Rev. Oral Biol Med*; **13**(6): 509-520.
15. **Nooshi H.** 1986 Studies on the adsorption of proteins to synthetic hydroxyapatite. *J Osaka Odont Soc.* **49**: 531-549.
16. **Norma ISO 7405 Draft International Standard ISO/DIS 7405.** 1997. Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry- Test methods. International Organization for Standardization. Genève. Switzerland.
17. **Pashley D, Walton R.** 1997. Histología y fisiología de la pulpa dental. En: Ingle J, Bakland L, editores. Endodoncia. Editorial Mc Graw Hill. 4ta ed. México.
18. **Posner AS.** 1985. The mineral bone. *Clin Orthop.* **200**: 87-99.
19. **Ten Cate A.R.** 1989. Hard tissue formation and destruction. En: Reinhardt RW, editor. Oral histology: development, structure and formation. Toronto. Canadá.

Recibido el 10 de julio de 2006

Aceptado para su publicación el 15 de septiembre de 2006