

## Repuesta ósea local en ratas a implantes metálicos en función del tiempo de implantación<sup>(·)</sup>

J.C. Rubio\*, C. Alonso\*\*, L. Burgos-Asperilla\*\*, M.C. García-Alonso\*\*\*, M.A. Alobera\*\*\*\*, C. Clemente\*\*\*\*\*,  
L. Munuera\*, M.L. Escudero\*\*\*

### Resumen

Se ha evaluado la respuesta ósea local, a implantes metálicos de uso endoprotésico, a distintos tiempos de evolución, desde el mes hasta los doce meses. Los tres materiales metálicos evaluados han sido una aleación de Co-Cr, cpTi, y la aleación MA 956 sobre cuya superficie se ha generado una capa de  $\gamma$ -alúmina, por oxidación. Los animales experimentales fueron ratas Wistar. La respuesta ósea a los materiales implantados se llevó a cabo mediante estudios histopatológicos por microscopía óptica, y la evaluación de la interfaz hueso-implante por microscopía electrónica de barrido. Se aprecia que la respuesta ósea local ante la presencia de un implante de titanio o de aleación MA 956, con capa de alúmina, fue adecuada y rápida, comenzando desde las primeras etapas, uno y tres meses, la diferenciación de tejido fibroso a tejido óseo. Esta diferenciación se ve consolidada de forma definitiva al cabo de los seis meses. Por el contrario, la respuesta del organismo ante la presencia de Co-Cr fue más lenta, de modo que a los seis meses la situación era equivalente a la de los otros implantes a los tres meses. Fue preciso esperar un año para alcanzar una situación similar entre los tres materiales estudiados.

### Palabras clave

Implantes metálicos. Hueso. Respuesta local. Ratas. *In vivo* test.

## Local bone response in rats to metallic implants at different times of implantation

### Abstract

We have evaluated the local bone response to metallic implants for endoprosthetic implants, over different periods of evolution, from one month to twelve months. The three metallic materials, that have been evaluated, are an alloy of Co-Cr, cpTi, and the MA 956 alloy on whose surface, a layer  $\gamma$ -alumina, has been generated by oxidation. The experimental animals used were Wistar rats. The local bone response to the implanted materials, was carried out, using histopathological studies with optical microscopes and the evaluation of the bone/implant interface was studied with a scanning electron microscope (SEM). It was observed that the local bone response in the presence of an implant of titanium or of the alloy MA 956, with an alumina layer, was appropriate and rapid. The differentiation between the fibrous tissue and the bone tissue started from the first stages, at one or three months. This differentiation was definitely consolidated after six months. On the other hand, the local bone response in the presence of Co-Cr was slower, so that after six months the bone response was equivalent to that of the other implants at three months. It was necessary to wait for a year in order to reach a similar bone response among the three materials studied.

### Keywords

Metallic implants. Bone. Local response. Rats *In vivo* test.

## 1. INTRODUCCIÓN

La respuesta ósea local, como estudio de biocompatibilidad a diferentes materiales implantados de forma permanente en el aparato locomotor, esta siendo ob-

jeto de interés y estudio por parte de numerosos investigadores. Algunos autores ponen de manifiesto la existencia de crecimiento de tejido óseo alrededor de implantes de titanio, hecho que no sucede cuando el material es acero inoxidable 316L o la aleación

(·) Trabajo recibido el día 27 de abril de 2007 y aceptado en su forma final el día 18 de abril de 2008.

\* Department of Orthopaedic Surgery, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, España.

\*\* Department of Chemical Physics, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

\*\*\* Department of Material Engineering, Degradation and Durability. CENIM, CSIC, Madrid, 28040 Madrid, Spain.

\*\*\*\* Department of Health Science, Universidad Rey Juan Carlos I, 28922 Madrid, Spain.

\*\*\*\*\* Faculty of Medicine, Universidad Alcalá de Henares, 28801 Madrid, Spain.

Co-Cr<sup>[1 y 2]</sup>. Otros autores han corroborado estas investigaciones, así, Breme *et al.*<sup>[3]</sup> realizaron un estudio comparativo entre titanio y acero 316L, implantando ambos materiales, en forma de mini placas, en patas de cerdos Hangford enanos. El resultado fue un crecimiento de tejido óseo alrededor de los implantes de titanio, mientras que hubo crecimiento de tejido fibroso de granulación poco vascularizado alrededor de los implantes de acero. Por otro lado, se llevó a cabo un estudio comparativo con otro tipo de materiales: titanio, como material metálico, titania, como cerámico y un material compuesto de titania e hidroxiapatita<sup>[4]</sup>. Estos materiales se implantaron en fémures de conejos durante 1 y 3 meses. Al final de los ensayos se valoró el tamaño de la interfaz hueso-implante y se vio que existía un hueco de unas 2 mm en el caso de titanio y ausencia de espacio en el caso de los otros dos materiales implantados. Ericson *et al.*<sup>[5]</sup> identificaron, también, en sus estudios, una zona de 2 a 10 mm entre hueso y titanio. Tisdal *et al.*<sup>[6]</sup> llevaron a cabo un estudio en fémures de conejos insertando aleación de TiAlV con y sin recubrimiento de hidroxiapatita. Los cortes histológicos mostraron que la aposición de hueso fue mayor en perímetro y más directa sobre aquellos implantes recubiertos. Por otra parte, Taoka *et al.*<sup>[7]</sup> compararon la respuesta osteogénica frente a la alúmina y alúmina recubierta de hidroxiapatita. Comprobaron una mejor y más directa aposición de hueso sobre los implantes compuestos de alúmina e hidroxiapatita. Sin embargo, otros autores<sup>[8]</sup> cuestionan el empleo de la alúmina, cuando los períodos de permanencia previstos en el organismo son prolongados, como es el caso de los implantes permanentes. Estos autores, a través de estudios histológicos de larga duración (seis y ocho meses en ratas y en cerdos) han demostrado que el contenido de aluminio en los fémures implantados con alúmina era muy superior al encontrado en los fémures de las ratas control. Moroni *et al.*<sup>[9]</sup> han encontrado, mediante microscopía electrónica de barrido, que el tamaño de la interfaz en el caso de implantes de alúmina mostraba valores de 100-150 mm entre hueso e implante de alúmina. La alúmina también ha sido estudiada, en monos, como material de refuerzo en materiales compuestos, en periodos comprendidos entre el mes y los ocho meses. Histológicamente, se observó una buena conexión entre hueso e implante, tanto para los materiales compuestos como para el titanio no recubierto que era el material de referencia<sup>[10]</sup>.

También, se está cuestionando en la literatura científica si ensayos de biocompatibilidad de corta duración, llevados a cabo, tanto *in vitro* como *in vivo*, con resultados satisfactorios, son extrapolables a largo plazo. Investigaciones recientes sobre un po-

límero adhesivo similar al hueso, llevadas a cabo en ovejas, durante seis meses, ha hecho cuestionar a los propios autores los buenos resultados previos hallados por ellos mismos en ensayos de biocompatibilidad de corta duración al cabo de las seis semanas<sup>[11]</sup>. Estudios comparativos de formación de hueso, llevados a cabo de una a seis semanas, en ratas que portaban implantes de materiales metálicos y cerámicos, han llevado a sus autores a concluir que los resultados obtenidos necesitan de una investigación más profunda y de un mayor tiempo de experimentación en un modelo animal, para asegurar los resultados de buena biocompatibilidad y la eficacia de estos materiales<sup>[12]</sup>.

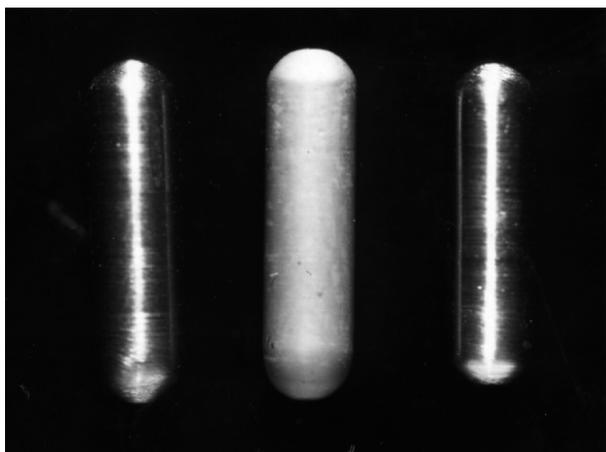
Como se ha visto en esta introducción, está fuertemente cuestionado si los ensayos de biocompatibilidad de corta duración sirven para deducir el comportamiento a largo plazo. Con esta problemática planteada, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la respuesta ósea local, en función del tiempo, teniendo en cuenta tanto ensayos de corta duración de un mes, a períodos prolongados, de un año, a distintos materiales metálicos de uso endoprotésico. Tampoco está claro el papel de la alúmina, como material biocerámico, si su respuesta en ensayos de larga duración es la adecuada o no. También, se ha evaluado esta respuesta ósea frente a la aleación MA 956 con una capa de alúmina en su superficie y se compara su respuesta con materiales metálicos de uso endoprotésico como titanio y la aleación Co-Cr.

## 2. TECNICA EXPERIMENTAL

### 2.1. Materiales

Los materiales metálicos en estudio fueron los siguientes: una aleación de Co-Cr cuya composición en % en peso fue: 35Co-35Ni-20Cr-10Mo, titanio comercialmente puro 99,7 % de Ti y una aleación de base Fe ( MA956), de composición (% en peso) Fe-20Cr-4,5Al-0,5Ti-0,5Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Esta aleación fue preoxidada a 1.100 °C durante 50 h, con el fin de generar en superficie una capa de  $\alpha$ -alúmina de 4  $\mu$ m de espesor<sup>[13 y 14]</sup>. El recubrimiento cerámico se genera para evitar la corrosión del sustrato metálico y al mismo tiempo aumentar el grado de biocompatibilidad de la aleación<sup>[15 y 16]</sup>.

Estos materiales se mecanizaron en forma de probetas cilíndricas de 6 mm de longitud y 1 mm de diámetro, como se muestra en la figura 1. Las probetas fueron desbastadas con papel abrasivo de SiC, en orden creciente, para finalizar con un pulido con una suspensión de alúmina de 1  $\mu$ m. Después, se limpiaron



**Figura 1.** Materiales metálicos insertados en la pata de las ratas Wistar de 6mm de longitud y 1mm de diámetro.

*Figure 1. Metallic materials inserted as implants in the hind legs of Wistar rats with 6 mm length and 1 mm diameter.*

en un baño de ultrasonidos con alcohol etílico y se esterilizaron por radiación ultravioleta (UV).

## 2.2. Técnica quirúrgica

Como material biológico se utilizaron un total de 25 ratas Wistar, albinas, hembras de 3 meses de edad y con un peso aproximado de 200 g. El método quirúrgico consistió en operar a la rata en decúbito supino. Se perforó un orificio de 1,1 mm y se insertó hacia el canal medular femoral la probeta metálica hasta quedar a nivel de superficie articular de fémur distal. La probeta insertada fue, siempre, de aleación MA 956, en la pata izquierda; mientras que, en el lado derecho, fue de titanio en unas series y de Co-Cr, en otras. De todas las ratas operadas una de ellas no fue evaluada, por presentar un cáncer de mama. Al final de la experimentación, se extrajeron ambos fémures de las 24 ratas para su posterior tratamiento y estudio. Cada fémur fue lavado en solución tamponada de fosfato potásico, denominada PBS (*phosphate buffer solution*) y fijado en paraformaldehído. A continuación, se realizaron tres cortes del fémur distal cada 2 mm mediante sierra con incrustaciones de diamante obteniéndose tres piezas de corte. Las dos piezas más distales, fueron empleadas para estudios histopatológicos, y la tercera pieza, se utilizó para estudio con microscopio electrónico de barrido (MEB). En total, se prepararon 144 probetas, 96 de las cuales se remiten para estudios histológicos y 48 para estudios de MEB.

## 2.3. Estudio histopatológico

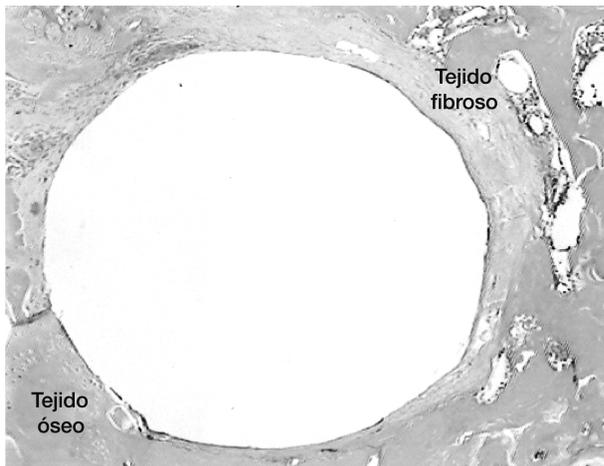
Previo a la observación por microscopio óptico las piezas se fijaron en formol al 10 % y, posteriormente, se decalcificaron utilizando Surgipath Decalcifier II (R) y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes, de 4  $\mu$ m de grosor, con microtomo Reitcher-Jung 2035. Unos cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y otros con tricrómico de Masson. Los cortes así obtenidos se observaron al microscopio óptico Nikon Labophot. El crecimiento óseo se valoró cuantitativamente midiendo el espesor de la laminilla ósea neoformada con el método de morfometría, a ojo. Se realizaron cuatro mediciones sobre las marcas de una cruz dispuesta al azar en el orificio donde, previamente, estaba el implante. Por último, se halla la media de los cuatro valores medidos, obteniéndose así un parámetro de crecimiento óseo alrededor del implante.

## 2.4. Estudio de osteointegración

Previo observación al MEB, las muestras fueron tratadas según la siguiente secuencia: 1) seis baños consecutivos de 15 min, cada uno, en PBS 0,1 M, para eliminar restos de tejido blandos adheridos al hueso; 2) tinción con tetróxido de osmio al 2 %, para fijar los tejidos mediante reacción con los lípidos. Se oxidan los ácidos grasos y se reduce el osmio a osmio metálico, dando una coloración negra. Este metal reducido confiere densidad y contraste a los tejidos biológicos; 3) baños en PBS 0,1M durante 15 min, cada uno, y deshidratación paulatina mediante; 4) baños sucesivos en alcohol etílico de 70°, 90° y de 100°, durante 15 min, en cada uno de ellos; y, por último; 5) baño en solución de alcohol de 100° más acetona al 50 % durante 15 min. Se embute en una resina endurecedora en frío, se procede al pulido de la superficie mediante papel abrasivo de SiC en orden creciente, seguida de pulido a espejo en un paño impregnado en pasta de diamante de granulometría <1  $\mu$ m. Por último, con el fin de hacer las muestras conductoras, se metalizan, mediante *sputtering*, con una fina capa de oro.

## 3. RESULTADOS

Mediante el estudio histológico se valoró, cualitativa y cuantitativamente, el crecimiento de tejido alrededor de los implantes y su evolución con el tiempo. La figura 2 muestra, a modo de ejemplo, una preparación histológica obtenida tras un mes de permanencia del implante en el animal experimental para una



**Figura 2.** Preparación histológica obtenida tras un mes de permanencia del Ti en el animal experimental.

*Figure 2. Histological tissue around the Ti implanted after one month of implantation in Wistard rat.*

probeta de titanio. Se puede apreciar cómo el crecimiento óseo alrededor del implante es escaso, predominando más un tejido fibroso que rellena el espacio entre el implante y el hueso. Las tablas I-IV recogen los valores obtenidos del espesor de la capa de tejido neoformado alrededor del implante, a distintos tiempos de evolución. De cada muestra se extrajeron cuatro datos alrededor de la circunferencia

**Tabla I.** Determinación de espesor de tejido neoformado alrededor de los implantes al mes de evolución. Valores expresados en  $\mu\text{m}$

*Table I. Thickness of the neoformed tissue around the implants at one month of evolution. Values in  $\mu\text{m}$*

PROBETA	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3	MEDIDA 4
Co-Cr-1	25,24	39,25	24,54*	34,75*
Co-Cr-2	45,80*	50,72*	42,28*	54,67*
Co-Cr-3	54,34*	49,02*	59,32*	55,70*
Ti-1	31,58	36,1	31,08*	34,63*
Ti-2	26,42	35,41*	32,31*	37,94*
Ti-3	30,35	28,47	35,47*	38,02*
MA-1	39,62	44,94	70,48*	102,04*
MA-2	34,63	49,14*	66,44*	60,82*
MA-3	26,13	30,13	37,63	38,72
MA-4	29,22	30,78	56,34*	58,26*
MA-5	31,62	61,28*	56,37*	52,25*
MA-6	42,46*	14,43*	58,01*	34,69*

**Tabla II.** Determinación de espesor de tejido neoformado alrededor de los implantes a los tres meses de evolución. Valores expresados en  $\mu\text{m}$

*Table II. Thickness of the neoformed tissue around the implants at three months of evolution. Values in  $\mu\text{m}$*

PROBETA	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3	MEDIDA 4
Co-Cr-4	41,87	33,78	96,69*	58,47*
Co-Cr-5	64,95*	62,47*	69,50*	60,05*
Co-Cr-6	97,95*	58,76*	53,87*	64,85*
Ti-4	26,6	32,65	36,1	32,26
Ti-5	93,81*	71,39*	31,15*	46,21*
Ti-6	40,5	41,07	38,98	57,14*
MA-7	21,69	36,1	43,05	20,4
MA-8	46,26	50,19	96,80*	58,44*
MA-9	43,39*	64,08*	51,50*	53,87*
MA-10	48,97	48,5	28,35	47,77
MA-11	40,29	39,67	42,92	52,65*
MA-12	46,28	42,63	62,36*	60,21*

**Tabla III.** Determinación de espesor de tejido neoformado alrededor de los implantes a los seis meses de evolución. Valores expresados en  $\mu\text{m}$

*Table III. Thickness of the neoformed tissue around the implants at six months of evolution. Values in  $\mu\text{m}$*

PROBETA	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3	MEDIDA 4
Co-Cr-7	54,95	101,32*	120,04*	87,92*
Co-Cr-8	34,75	35,69	36,96	30,61
Co-Cr-9	42,63	72,92*	71,45*	64,28*
Ti-7	50,4	47,64	29,71	20,2
Ti-8	42,61	35,11	44,94	36,73*
Ti-9	35,64	30,61	27,75	31,15
MA-13	68,64	57,71	35,76	104,12
MA-14	55,34	50,28	49,74	57,37
MA-15	50,38	25,43	31,79	35,32
MA-16	36,01	27,32	44,61	39,28
MA-17	30,61	38,5	27,38	43,05
MA-18	95,97*	90,37*	67,34*	106,06*

(Fig. 2). Las cifras de las tablas, acompañadas de asterisco y en casilla sombreada corresponden a medidas de tejido fibroso, las casillas blancas corresponden a tejido óseo. La tabla I recoge el tejido neoformado alrededor de los implantes, al mes de evolución.

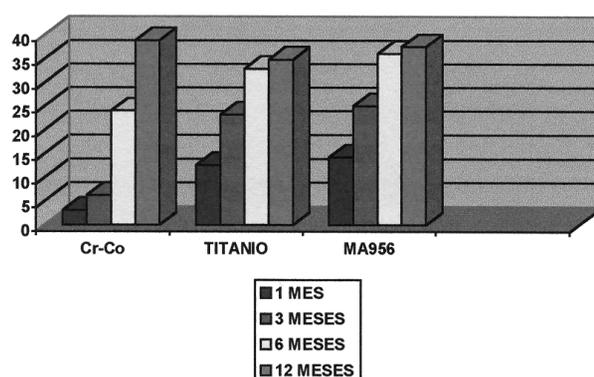
**Tabla IV.** Determinación de espesor de tejido neoformado alrededor de los implantes a los doce meses de evolución. Valores expresados en  $\mu\text{m}$ .

*Table IV. Thickness of the neoformed tissue around the implants at twelve months of evolution. Values in  $\mu\text{m}$ .*

PROBETA	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3	MEDIDA 4
Co-Cr-10	37,72	40,25	35,67	39,47
Co-Cr-11	56,44	36,97	40,25	52
Co-Cr-12	32,26	18,36	44,75	34,75
Ti-10	43,05	41,32	34,63	30,68
Ti-11	33,22	41,4	37,15	36,39*
Ti-12	36,5	47,11	35,11	38,98
MA-19	32,26	36,96	30,61	26,13
MA-20	36,79	35,11	29,22	45,31
MA-21	43,16	20,09	42,61	27,75
MA-22	64,53	50,06	44,31	70,62
MA-23	41,87	32,26	37,52	40,81
MA-24	28,35	33,96	24,91	27,38

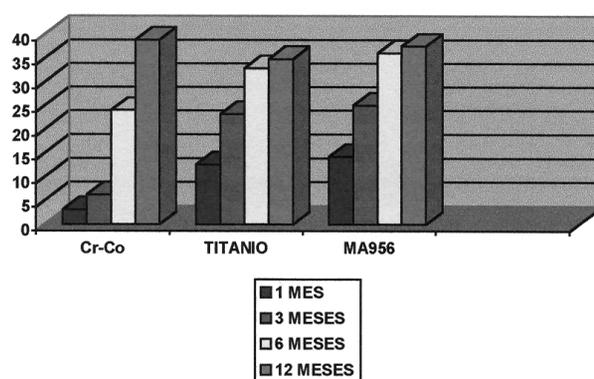
Se puede observar un predominio de tejido fibroso alrededor de todos los implantes, siendo más acusado en el caso de los implantes Co-Cr. La tabla II muestra la evolución a los tres meses, donde se puede apreciar cómo el tejido fibroso va siendo sustituido por tejido óseo. El mayor crecimiento óseo se aprecia tanto en los implantes de titanio como de aleación MA con capa de alúmina. Las tablas III y IV muestran el espesor de capa neoformada a los seis y doce meses de evolución respectivamente. Al cabo de los doce meses se puede observar como todos los implantes muestran los mismos resultados.

La figura 3 resume los valores medios globales de tejido óseo neoformado alrededor del implante, para cada material y tiempo. Se puede observar como la respuesta a los tres meses, es más adecuada y rápida para los tejidos que portan tanto implantes de titanio como de aleación MA 956 con capa de alúmina. En la figura 4 se presentan, a modo de resumen, los valores medios de fracción de hueso o índice óseo, definido como la relación existente entre la parte rodeada por el hueso y el perímetro total del mismo, variando su valor entre 0 y 1. La figura 4 muestra, también, la evolución con el tiempo, desde uno a doce meses, de éste índice óseo para los tres materiales ensayados. Se puede observar como a los tres meses el índice óseo en los implantes con capa de alúmina es del orden de 0,6 y a los seis meses de 0,8. El comportamiento de los implantes de titanio es similar y los implantes de Co-Cr alcanzan un valor de 0,4 a los



**Figura 3.** Evolución del espesor de tejido óseo alrededor del implante para cada material y tiempo.

*Figure 3. Evolution over time from one to twelve months of bone tissue for the tested materials.*

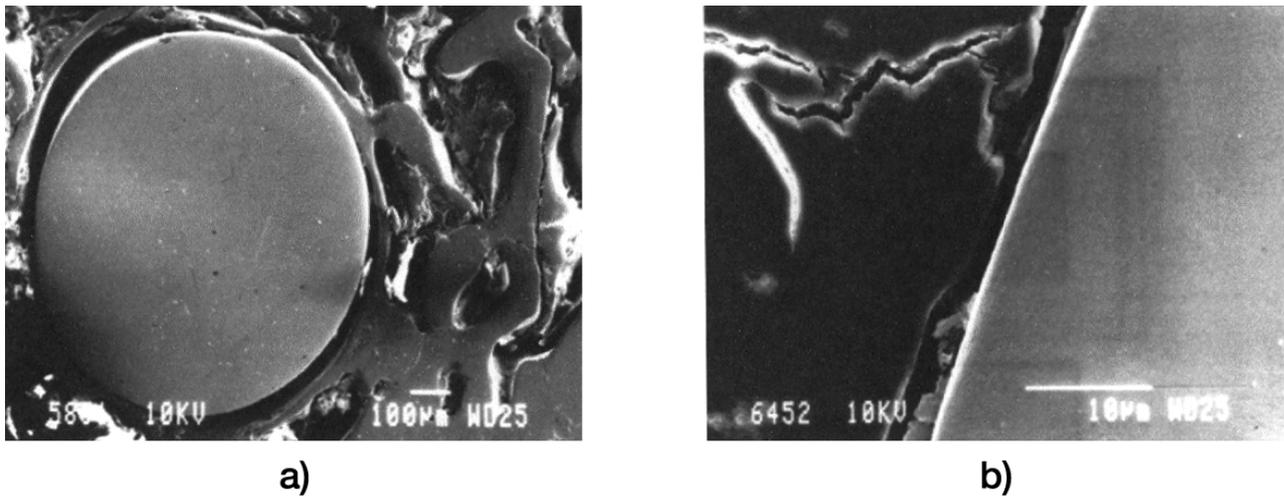


**Figura 4.** Evolución del índice óseo para cada material y tiempo.

*Figure 4. Evolution over time from one to twelve months of bone fraction for the tested materials.*

seis meses de evolución. Solo se igualan los índices óseos, entre los tres materiales, a los doce meses de evolución.

La interfaz hueso-implante se evaluó por microscopía electrónica de barrido. La figura 5 A) muestra un corte transversal de un implante de Co-Cr insertado en una rata, al mes de evolución. Se aprecia cómo el espacio entre hueso e implante es superior a 20  $\mu\text{m}$ ; este gran espacio en otras preparaciones ocasionó la pérdida de los implantes de Co-Cr en las preparaciones del MEB. En el caso del titanio y de la aleación MA con capa de alúmina, el espacio era de unas 5  $\mu\text{m}$  (Fig. 5 B)), para el mismo tiempo de evolución. A los tres meses, el hueso ha crecido alrededor de los tres implantes: en el caso del Co-Cr el hueco en la interfaz oscila entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ ; en el caso



**Figura 5.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido al mes de evolución: A) con implante de CoCr (X80) y B) con implante de Ti (X2500).

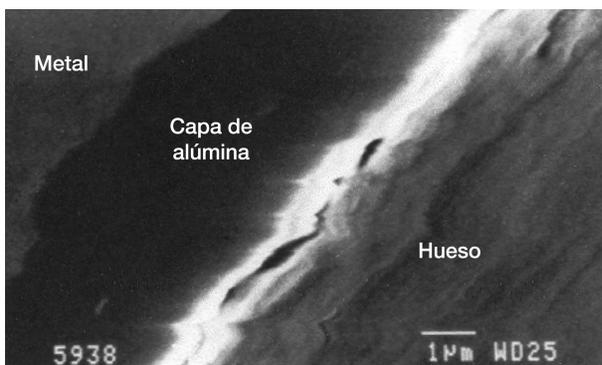
*Figure 5. Micrographs by SEM of a cross sections of A) CoCr (X80) and B) Ti (x2500) implanted in the hind leg of rats after one month of evolution.*

de titanio es inferior a  $1\ \mu\text{m}$ , y los implantes de MA con capa de alúmina se encuentran completamente rodeados de hueso, siendo preciso subir a 10.000 aumentos para apreciar una interfaz inferior a  $1\ \mu\text{m}$  (Fig. 6). A los seis meses, el crecimiento óseo alrededor de los implantes de Co-Cr ha aumentado con trábeculas finas y se aprecia un espacio hueso-implante de, aproximadamente,  $1\ \mu\text{m}$ . En los implantes de Ti y de aleación MA no se aprecian variaciones significativas en el tamaño de la interfaz con respecto a lo medido a los tres meses. La aleación MA

presenta una buena aposición de hueso y total ausencia de espacio libre a su alrededor. A los doce meses, la evolución de la interfaz es la misma en los tres tipos de materiales ensayados.

#### 4. DISCUSIÓN

Una vez superados los problemas de infección y los fallos del material por fatiga, tan frecuentes en las primeras etapas, en el mundo de la artroplastia, hoy en día, se pretende conseguir prótesis que alcancen mayores vidas en servicio lo que implica un mayor grado de biocompatibilidad de los materiales. Se trata, en definitiva, de valorar y, si es posible, aumentar la biocompatibilidad de los materiales que van a ser utilizados como implantes quirúrgicos. El trabajo de investigación que se ha planteado compara el grado de biocompatibilidad de diferentes materiales metálicos, basándose en el estudio de la respuesta ósea local que se produce en los animales experimentales implantados, para distintos tiempos de ensayo. Siguiendo los criterios de Williams<sup>[17]</sup> se tiene que la respuesta de un organismo ante la presencia de un implante pasa por cuatro fases: 1) la inmediata post-implantación; 2) los fenómenos interactivos que se producen en la interfaz derivados del funcionamiento normal de la prótesis; 3) las alteraciones derivadas de los procesos de degradación como corrosión y desgaste; y 4) las reacciones alejadas o sistémicas generalizadas.



**Figura 6.** Micrografía de microscopio electrónico de barrido a los tres meses de evolución de una probeta de MA con capa de  $\alpha$ -alúmina (X10000).

*Figure 6. Micrograph by SEM of a cross section of MA 956 alloy coated with  $\alpha$ -alumina implanted in the hind leg of rats after three month of evolution.*

En este trabajo de investigación se han evaluado las fases 1, 2 y 3, siendo objeto de otra investigación aparte la fase 4<sup>[18]</sup>. La primera fase no es más que la respuesta inflamatoria local del organismo ante la herida, en este caso, quirúrgica, que supone la colocación de un implante. Esta primera fase se ha evaluado, en nuestro estudio, a través de las preparaciones histológicas, sin implante mediante microscopio óptico y con implante a través del MEB después de un mes de portar el material de implante el animal experimental. La respuesta inmediata del organismo frente a los tres materiales metálicos es parecida (Fig. 2 y Tabla I); en las preparaciones histológicas se puede apreciar como el hematoma post-quirúrgico ha sido sustituido por tejido fibroso denso, que encapsula al implante, con un espesor que varía entre 30 y 60  $\mu\text{m}$  (Tabla I y Fig. 5 A) y B)). Este tejido fibroso va diferenciándose, paulatinamente, a tejido óseo, más rápidamente en las preparaciones con implantes de titanio y aleación MA con capa que en el caso de los implantes de Co-Cr (Tabla II).

Las fases 2 y 3 de Williams se evaluaron, en nuestro estudio, en las observaciones de las muestras correspondientes a tres, seis y doce meses de evolución. A los tres meses, se obtienen las diferencias más significativas entre los tres materiales metálicos estudiados. Una vez concluido el proceso inflamatorio se pasa a la fase de reparación, donde el tejido fibroso, formado en las primeras etapas, va siendo sustituido por tejido óseo. La evolución a tejido óseo, en los implantes de Co-Cr es escasa (comparar tablas I y II), por el contrario, las muestras de titanio y de aleación MA 956 presentan una aposición íntima de tejido óseo sobre el implante, con lagunas de matriz osteoide, imagen propia de un hueso en formación y con una escasa presencia de tejido fibroso a su alrededor (comparar tablas I y II).

A los seis meses, los implantes de titanio y de MA con capa de alúmina, se hallan completamente rodeados de tejido óseo maduro de morfología normal, a veces tapizado en su cara interna por una fina lámina conectiva. Los implantes de Co-Cr se encuentran rodeados de áreas de tejido óseo alternando con tejido fibroso dando una imagen similar a la obtenida para el titanio y la MA a los tres meses (comparar tablas II y III). En las imágenes de MEB se puede observar cómo es necesario esperar hasta este tiempo de evolución (seis meses) para que la interfaz de Co-Cr vaya disminuyendo paulatinamente su dimensión hasta alcanzar el valor de 1 mm. Como resumen se tiene que la respuesta ósea frente a la capa de alúmina de la aleación MA 956 fue rápida y eficaz como revelan los datos del índice óseo que ya, para tres meses, era del orden del 0,6 y a los seis meses era del 0,8 como se puede ver en la figura 4. La interfaz por MEB

incluso a 10.000 aumentos (Fig. 6) no era valorable, siendo inferior a 1  $\mu\text{m}$ , lo cual implica una aposición directa del hueso sobre el implante. Además, en esta imagen se puede observar una capa de alúmina sin imperfecciones perfectamente adherida al substrato metálico, a pesar de todas las agresiones sufridas, tanto quirúrgicas, como mecánicas y químicas, durante las distintas fases de experimentación. El resultado final es una excelente biocompatibilidad del sistema  $\alpha$ -alúmina / MA 956, detectada por la excelente respuesta ósea local.

Por último, cabe señalar que, al cabo de los doce meses, los tres tipos de implantes en estudio se hallan rodeados, totalmente, de tejido óseo de forma similar y con un mismo espesor de hueso neoformado. No se ha encontrado en la bibliografía revisada datos que pudieran resultar comparativos para este tiempo de evolución, dado que el tiempo máximo de permanencia en experimentación animal en ratas no suele ser superior a los seis meses.

## 5. CONCLUSIONES

La respuesta del organismo en cuanto a crecimiento de tejido óseo neoformado alrededor del implante fue mejor y más precoz frente al titanio y a la aleación MA 956 recubierta de alúmina, que frente al Co-Cr, para tiempos cortos y medios de evolución, uno y tres meses, respectivamente. Para tiempos largos, doce meses, dicha respuesta alcanzó unos valores similares, con independencia del tipo de implante.

La aposición de hueso directamente sobre el implante solo se consigue en el caso de la alúmina que recubre a la aleación MA 956 y el titanio. En el caso de la aleación de Co-Cr existe un espacio, incluso a tiempos largos de evolución, que estaría relleno, en el animal vivo, de tejido conectivo.

La capa de alúmina que recubre la MA 956, examinada por MEB, posee una gran resistencia y adherencia al sustrato metálico, habiendo resistido sin daño alguno tanto la manipulación quirúrgica durante la implantación, como las condiciones del tejido vivo durante su permanencia en el mismo, así como la agresión mecánica y química durante la preparación histológica.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la CICYT la financiación del proyecto con referencia: CTQ2005-08712-C02-01-02/BQU.

## REFERENCIAS

- [1] J. SIMPSON. N.B.S., *Spec. Publ.* 601 (1981) 395-422.
- [2] P.I. BRANEMARK, R. ADELL, T. ALBREKTSSON, U. LEKHOLM, S. LUNDKVIST Y B. ROCKLER, *Biomaterials*. 4 (1983) 25-28.
- [3] J. BREME, E. STEINHAUSER Y G. PAULUS, *Biomaterials*. 9 (1988) 310-313.
- [4] J. LI. *Biomaterials*. 14 (1993) 229-232.
- [5] L. E. ERICSON, L. SENNERBY, G. BOKHEDE, L. EMANUELSSON Y P. THOMSEN, *Clinical Implants Materials. Advances in Biomaterials*, Elsevier, Amsterdam, 9, 1990, pp. 333-337.
- [6] C.L. TISDEL, V.M. GOLDBERG, J.A. PARR, J.S. BENSUSAN, L.S. STAIKOFF Y S. STEVENSON, *J. Bone Joint Surg.* 76-A (1994) 159-171.
- [7] T. TAKAOKA, M. OKAMURA, H. OHGUSHI, K. INOUE, Y. TAKAKURA Y S. TAMAI, *Biomaterials*. 17 (1996) 1495-1505.
- [8] M. LEWANDOWSKA-SZUMIEL Y J. KOMENDER, *Clin. Mater.* 5 (1990) 167-175.
- [9] A. MORONI, *Bioceramics 2. German Ceramics Society. Germany*, 1990, pp. 125-131.
- [10] A. NORDLUND, L. ZETTERQVIST Y A. ODÉN. *Int. J. Oral Max. Surg.* 18 (1989) 373-377.
- [11] L. GROSSTERLINDEN, A. JANSSEN, N. SCHMITZ, M. PRIEMEL, P. POGODA, M. AMLING, J.M. RUEGER Y W. LINHART, *Biomaterials* 27 (2006) 3.379-3.386.
- [12] E.H.M. HARTMAN, J.W.M. VEHOFF, P.H.M. SPAUWEN Y J.A. JANSSEN, *Biomaterials*. 26 (2005) 1.829-1.835.
- [13] M.C. GARCÍA-ALONSO, J.L. GÓNZALEZ-CARRASCO, M.L. ESCUDERO Y J. CHAO, *Oxid. Met.* 53 (2000) 77-98.
- [14] J.L. GÓNZALEZ-CARRASCO, M.C. GARCÍA-ALONSO, M.A. MONTEALEGRE, M.L. ESCUDERO Y J. CHAO, *Oxid. Met.* 55 (2001) 209-221.
- [15] M.C. GARCÍA-ALONSO, M.L. ESCUDERO Y J.L. GÓNZALEZ-CARRASCO, *Mater. Corros.* 52 (2001) 524-530.
- [16] M.L. ESCUDERO, J. RUIZ, J.L. GÓNZALEZ-CARRASCO, J. CHAO, M.F. LÓPEZ Y M.C. GARCÍA-ALONSO, *Rev. Metal. Madrid.* 34 (1998) 83-86.
- [17] D.F. WILLIAMS. *Review. Journal of Materials Science.* 22 (1987) 3.421-3.445.
- [18] J.C. RUBIO, M.C. GARCÍA-ALONSO, C. ALONSO, M.A. ALOBERA, C. CLEMENTE, L. MUNUERA Y M.L. ESCUDERO, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 19 (2008) 369-375.