

# Evaluación de ensayos *in vivo* e *in vitro* de materiales para implantes ortopédicos: estudio preliminar<sup>1</sup>

I. GALLARDO,\* C. BORDENAVE,\*\* J. C. ORELLANO,\*\* P. GALLIANO\* y J. M. PORTO LÓPEZ\*

\*Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales y \*\*Hospital General de Agudos "Oscar Allende". Mar del Plata. Provincia de Buenos Aires.

**RESUMEN.** Se analizó comparativamente el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de un vidrio bioactivo de composición similar a productos utilizados como relleno óseo, y geles de sílice con características superficiales comparables a las de los vidrios bioactivos a poco tiempo de ser implantados. La evaluación *in vitro* se realizó por análisis de las superficies de las muestras luego de sumergidas en soluciones inorgánicas acelulares a pH 7,3 y 37° C. Dicho análisis reveló la precipitación de carbonatoapatita sobre la superficie de los geles a mayores tiempos de exposición que en los vidrios bioactivos. El estudio *in vivo* se realizó mediante una técnica de implantación subcutánea; también se ensayaron hidroxiapatita comercial y hueso bovino desmineralizado. El análisis histológico determinó la ausencia de osteoinducción y la presencia de reacciones inflamatorias no-inmunogénicas de diferente magnitud ante las partículas de hidroxiapatita, vidrio y geles. La respuesta inmunológica provocada por el hueso desmineralizado interferiría con la formación esperable de tejido óseo. Se observaron granulomas inflamatorios provocados por los geles, que pueden estar relacionados con la disolución y liberación de especies potencialmente citotóxicas. Se propone al tiempo de formación de la capa de carbonatoapatita como un parámetro crítico para la biocompatibilidad de materiales con componentes solubles de cierta toxicidad.

**PALABRAS CLAVE:** Implantes ortopédicos. Biomateriales. Investigación.

**EVALUATION OF IN VIVO AND IN VITRO ESSAYS OF MATERIALS FOR ORTHOPEDIC IMPLANTS: PRELIMINARY STUDY**

**ABSTRACT.** A comparative analysis was performed of the *in vitro* and *in vivo* behavior of a bioactive glass (with similar composition to that of a commercially available synthetic bone graft material) and silica-gels of related surface characteristics after being implanted in the body. *In vitro* evaluation was done by analyzing the surfaces of the samples after being soaked in acellular inorganic solutions at pH 7.3 and 37° C. The precipitation of a carbonate-apatite on the gel surfaces took place at times longer than on the glass surface. *In vivo* evaluation was done using a subcutaneous implantation method. Commercial hydroxyapatite and demineralized bovine bone were also implanted and evaluated. Results of the histological study showed the absence of osteoinduction, and the presence of different kinds of non-immunogenic inflammatory reactions around the hydroxyapatite, glass and gel particles. The immune response induced by the demineralized bone particles might interfere with the expected bony tissue formation. Inflammatory granuloma were observed around the gel particles, related to dissolution and release of partially cytotoxic species from these samples. The time of formation of the carbonate-apatite layer is proposed as a critical parameter in the biocompatibility of material which could release soluble components that have some toxicity.

**KEY WORDS:** Orthopedic implants. Biomaterials. Research.

---

Premio "Prof. Dr. Carlos Ottolenghi" al mejor aporte presentado en el Forum de Investigación - XXXIV Congreso Argentino de Ortopedia y Traumatología, Buenos Aires, Argentina, 1997. *Correspondencia:*

Dr. I. GALLARDO  
Univ. Nac. De Mar del Plata, Fac. de Ing.  
Div. Cerámicos - INTEMA  
Avda. Juan B. Justo 4302  
(7600) Mar del Plata  
Pcia. de Buenos Aires,  
Argentina.

En los últimos años un gran número de materiales para implantología ósea han ingresado en el mercado o se encuentran en una etapa avanzada de investigación y desarrollo. Muchos de estos materiales son llamados bioactivos por ser capaces de generar una unión directa al hueso.<sup>9,25</sup> Diferentes mecanismos parecen estar involucrados en el proceso, aún no del todo dilucidado de la bioactividad.<sup>19</sup> De acuerdo al tipo de mecanismo predominante, podemos distinguir a los materiales ortopédicos<sup>26</sup> entre aquellos que inducen la diferenciación de células mesenquimáti-

cas en osteoblastos (materiales osteoinductores), y los que actúan solamente como guías sobre cuya superficie el hueso es capaz de crecer (materiales osteoconductores). También podemos incluir en esta clasificación a aquellos materiales que proveen por sí mismos de células formadoras de hueso (materiales osteogénicos). Entre los productos comerciales más conocidos obtenidos a partir de materiales bioactivos podemos mencionar al Bioglass® (vidrios), Cerabone®, Ceravital® (vitrocerámicos), Cerapatite®, Interpore® (hidroxiapatita), entre otros.

El comportamiento biológico de los biomateriales está determinado en gran medida por las características de su superficie.<sup>8"</sup> Con respecto a la hidroxiapatita, su similitud con la fase mineral presente en el tejido óseo es la responsable de su biocompatibilidad.<sup>1"</sup> Los vidrios y vitrocerámicos bioactivos parecen liberar, al poco tiempo de ser implantados, especies solubles de sílice capaces de polimerizar y reprecipitar en forma de gel sobre su superficie. Ambos procesos jugarían un rol importante en las primeras etapas de la mineralización sobre estos materiales, que culmina con la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) y la unión directa al hueso, sin tejido fibroso en la interfase.<sup>2</sup> El gel de sílice proporcionaría los sitios de nucleación para la formación de HCA,<sup>24</sup> función que cumple el colágeno en el proceso natural de osificación.<sup>17,30</sup>

Una variante utilizada para la evaluación *in vivo* de estos materiales consiste en su implantación subcutánea.<sup>20,21,23</sup> Esta metodología de trabajo presenta una técnica quirúrgica sensiblemente más sencilla que otras, y aumenta el número de ensayos que se pueden realizar por animal. La observación de la respuesta inflamatoria generada permite evaluar rápidamente la reacción del tejido a la presencia del material, a través de las características del tejido fibroso periférico al implante y del componente inflamatorio expresado. Además, se puede identificar fácilmente cualquier fenómeno de osteoinducción por la observación de osificación heterotópica a partir del material.

El objetivo del presente trabajo es analizar comparativamente el comportamiento, tanto *in vivo* como *in vitro*, de una serie de materiales similares a los usados en implantología ósea, y a partir de dicho análisis determinar las condiciones en las cuales los ensayos *in vitro* son capaces de otorgar información válida acerca de la bioactividad del material. Para ello se sintetizaron y evaluaron muestras de un vidrio bioactivo de silicofosfato de calcio, y geles de sílice micro y manoporosa obtenida a partir de precursores orgánicos. Estos geles presentarían características superficiales comparables a

las que presentan los vidrios bioactivos a poco tiempo de ser implantados. Para la evaluación *in vivo* de las muestras se escogió el ensayo de implantación subcutánea, a pesar de no ser el más comúnmente empleado para estos materiales, debido a las ventajas antes mencionadas. A modo de comparación se incluyeron en la evaluación *in vivo* partículas de hidroxiapatita comercial (HA) y de hueso bovino desmineralizado (HDM). Con respecto a la evaluación *in vitro*, se seleccionó un ensayo ampliamente utilizado en estos sistemas, consistente en la inmersión de muestras en la solución inorgánica acelular FCS (fluido corporal simulado) a pH 7,3 y 37° C, y su posterior evaluación superficial.<sup>5,14</sup>

## Material y método

### Preparación y caracterización de las muestras

#### Vidrio bioactivo

Muestras de vidrio bioactivo (VB) de silicofosfato de calcio fueron preparadas a partir de la fusión de las materias primas correspondientes en un crisol de Pt a 1600°C durante 150 min. La composición del vidrio VB (54,16% de CaO, 38,15% de SiO<sub>2</sub>, y 7,69% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; porcentajes expresados en moles) es similar a la correspondiente al vitrocerámico Cerabone®, desarrollado por Kokubo y cols., pero carece de MgO, ya que se observó que su presencia desfavorece la velocidad de precipitación *in vitro* de HCA.<sup>7</sup>

#### Geles de sílice

Es posible obtener geles de sílice microporosos con una estructura controlada mediante la técnica de sol-gel, con el agregado de un polímero que provoque una separación de fases en el sistema reactivo, lo que genera dominios ricos en polímero y dominios ricos en sílice.<sup>18</sup> Por calcinación, se elimina el polímero orgánico, dejando libres los poros creados. Variaciones en la composición inicial y en la temperatura de síntesis permiten controlar la microestructura del producto.

Como fuente de sílice se utilizó tetraetilortosilicato (TEOS, 98%, Aldrich) y ácido poliacrílico (PA, solución acuosa al 25%, PM 240000, Aldrich) como fase orgánica. La reacción se condujo bajo catálisis ácida.

Las muestras se realizaron con una relación molar agua/TEOS de 9,5 en promedio y a pH 0,45. Las diferentes composiciones se obtuvieron al variar la cantidad de ácido poliacrílico, y por tanto la relación molar monómero PA/monómero TEOS (c, en la Tabla 1). Las reacciones de gelación y envejecimiento de las muestras se realizaron a 40, 60 80 y 100°C. Las designaciones y composiciones de las muestras se indican en la Tabla 1.

Las muestras fueron lavadas durante 6 horas en

**Tabla 1.** Designación y composición de los geles de sílice sintetizados

Muestra	PA ( $\times 10^1$ )*	TEOS ( $10^1$ )*	H <sub>2</sub> O**	c
M3xx	3,81	31,40	0,30	0,121
M4xx	4,77	31,40	0,30	0,152
MSxx	5,72	31,40	0,30	0,182

\* En moles de monómero.

\*\* En moles, xx Temperatura de gelación y envejecimiento.

una solución de alcohol etílico al 50% en volumen, con recambio de la solución cada 2 horas. Para la eliminación de la fase orgánica, se utilizó una velocidad de calentamiento de 1 °C/min, hasta llegar a 400°C, temperatura que se mantuvo constante durante dos horas. Posteriormente se enfrió a una velocidad de 10°C/min.

Se realizó una evaluación química y microestructural de los geles obtenidos mediante espectroscopia infrarroja de reflectancia con transformada de Fourier (espectrofotómetro FTIR Briker IFS125), y microscopia electrónica de barrido (SEM). La técnica de FTIR permitió corroborar la eliminación de los agregados orgánicos y la obtención de sílice. Al utilizar la SEM se observaron las microestructuras de los geles obtenidos, variables en función de la composición y temperatura de procesamiento.

*Hueso bovino desmineralizado (HDM)* Para la obtención del HDM se sumergieron láminas de 2 mm de diámetro de hueso cortical femoral bovino en solución de HCL 0,4 N, durante 12 horas. La solución se renovó cada 4 horas. Posteriormente se enjuagó con agua destilada hasta verificar un pH neutro. El agua y el material graso restantes se extrajeron utilizando alcohol y éter etílico. Se mantuvo a temperatura ambiente bajo campana durante 24 horas a fin de evaporar el éter remanente.<sup>1,27</sup> El material resultante se conservó en alcohol etílico hasta su uso.

#### *Hidroxiapatita*

Se utilizó hidroxiapatita sintética comercial producida por Sigma Chemical Co.

#### *Evaluación del comportamiento in vitro*

##### *Condiciones de ensayo*

La bibliografía refiere ampliamente la utilización de fluido corporal simulado (FCS) como medio de inmersión para la realización de ensayos *in vitro*.<sup>6,9,14</sup> Esta solución contiene concentraciones iónicas muy similares a las observadas en el plas-

ma sanguíneo y fue preparada mediante la disolución de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H.12HA ClK, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, SO<sub>4</sub>Ca.HCl, CaCl<sub>2</sub>, y NaHCO<sub>3</sub> en agua destilada. Se empleó además como solución tampón (*buffer*) Tris-(hidroximetil)-aminometano (99%, Mallinckrodt) para mantener la solución a pH 7,3 a 37°C. Concretamente para el estudio de formación de depósitos de fosfatos cálcicos, numerosos autores señalan el uso de FCS modificadas, donde al aumentar la concentración de Ca<sup>2+</sup> se acelera la velocidad de deposición, lo que disminuye el tiempo de ensayo.<sup>5</sup> En la Tabla 2 se detallan las composiciones de las soluciones empleadas.

Se ensayaron todos los geles de sílice sintetizados y simultáneamente el vidrio bioactivo (VB) como control, en ambas soluciones. Se utilizó una relación de volúmenes constante entre muestra y solución. Se sumergieron piezas de aproximadamente 5 mm x 5 mm x 3 mm en 15 ml de solución por distintos períodos de tiempo. Luego de extraídas las muestras, se las dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos, para su posterior análisis.

#### *Caracterización de las superficies*

Las estructuras superficiales de las muestras de gel de sílice y los depósitos formados fueron analizados, luego de retiradas las muestras de las soluciones, mediante FTIR, SEM y análisis químico por microsonda electrónica (EPMA).

#### *Ensayos in vivo*

##### *Técnica quirúrgica*

A fin de evaluar *in vivo* gran cantidad de muestras en un período de tiempo corto, hemos desarrollado un protocolo consistente en la implantación subcutánea del material a ensayar, a partir del éxito comunicado por otros autores en experiencias similares.<sup>3,12,23,29</sup>

Se utilizaron ratas raza Lew, con un peso promedio de 350 g, anestesiadas con 1 cm<sup>3</sup> de Inno-

**Tabla 2.** Concentraciones (mM) de especies iónicas en las soluciones utilizadas *in vitro* y en el plasma sanguíneo humano

Especie	Plasma sanguíneo	FCS	FCS-1,5
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0	142,0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0	5,0
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5	3,75
Cl	103,0	148,8	148,8
HCO <sub>3</sub>	27,0	4,2	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,5	0,5

van. Se desinfectó la zona de intervención con solución yodada y se realizaron incisiones de 2 cm de largo en los sitios indicados en la figura 1.

Se procedió a realizar una disección cuidadosa a fin de crear un espacio subcutáneo en el cual se colocó el material.

Se implantaron muestras de aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^3$  en polvo, con un tamaño de partícula entre  $150 \mu\text{m}$  y  $35 \mu\text{m}$ , excepto para el HDM, donde el tamaño de los fragmentos fue de aproximadamente  $0,5 \text{ mm}^3$ . Las muestras inorgánicas fueron esterilizadas en autoclave. Todas las muestras fueron colocadas de modo de asegurar el contacto con la fascia muscular. Las heridas se cerraron y se realizó un control constante de los animales a fin de detectar signos de inflamación o infección.

Se seleccionaron para el estudio aquellos geles de sílice que presentaron más rápida formación de fosfato calcico *in vitro* (M340 y M480). Además se implantaron HA, HDM y VB. Se efectuaron entre 2 y 4 implantes por tipo de material. Las muestras fueron colocadas al azar en los sitios indicados. Se retiraron luego de 28 días de implantadas junto al tejido circundante y se sumergieron en forma inmediata en formol neutro.

#### Examen histológico

Los especímenes fueron embebidos en parafina, cortados, y teñidos con hematoxilina-eosina (HE) según el procedimiento habitual. Se analizaron las secciones mediante microscopía óptica en base al siguiente esquema:

**Respuesta inflamatoria.** La evaluación de la respuesta inflamatoria se realizó de acuerdo al tipo y cantidad de especies celulares observadas. Se clasificó en respuesta leve a moderada, moderada e importante y respuesta severa.

**Formación de cápsula fibrosa.** Se estimó en forma comparativa el espesor y la densidad de la cápsula fibrosa adyacente a la superficie externa del implante, en contacto con el tejido circundante.



**Figura 1.** Ubicación de las muestras en el ensayo *in vivo* en ratas.

Se diferenció entre cápsula completa o pseudocápsula y se estableció una escala de acuerdo al espesor de ésta: delgada, intermedia y gruesa.

**Vascularización.** Se observó la presencia de vasos sanguíneos en la zona periférica al implante.

**Capacidad osteoinductiva.** Se evaluó de acuerdo a la presencia de osteoblastos u osteocitos en contacto con el implante.

## Resultados

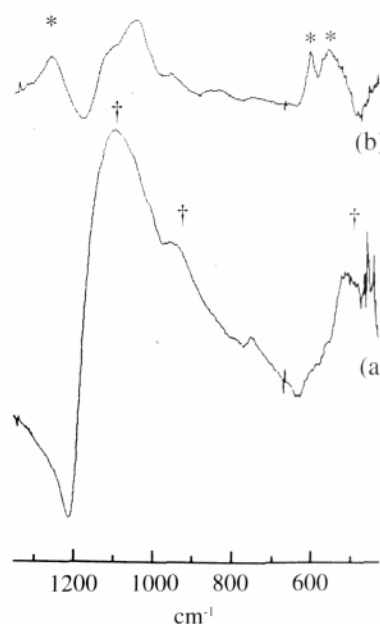
### Formación de carbonatoapatita (HCA) *in vitro*

#### Vidrio bioactivo (VB)

Se detectó la formación de HCA *in vitro* por FTIR, a las 8 horas de sumergido en FCS. A fin de comparar la naturaleza del depósito formado en FCS, se presenta el espectro de FTIR obtenido luego de 24 hs de inmersión (Fig. 2).

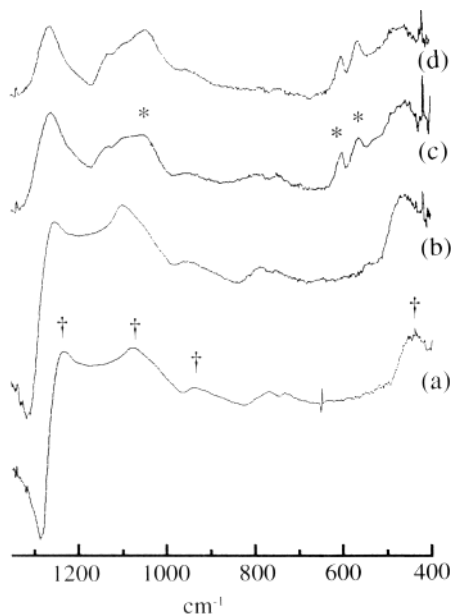
#### Geles de sílice

Se realizó un exhaustivo seguimiento de la formación de HCA *in vitro* por FTIR. El uso de FCS-1,5 aceleró el proceso de deposición, pero se mantuvieron las velocidades relativas de deposición en FCS y FCS-1,5 entre las muestras analizadas. A continuación se exponen los resultados obtenidos para las muestras M340 (Fig. 3) y M480 (Fig. 4) en FCS-1,5, en las que el depósito se formó con mayor velocidad. Se indican las señales correspondientes al estiramiento del enlace P-O a  $1025 \text{ cm}^{-1}$



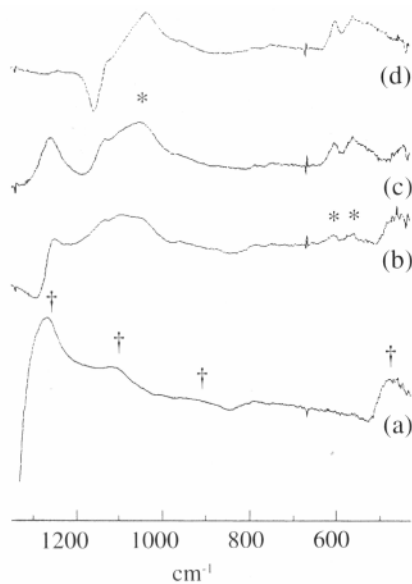
†Señales de sílice y de \*HCA.

**Figura 2.** Espectros de FTIR correspondientes a VB a) antes de la inmersión b) 24 hs en FCS-1.5



†Señales de sílice y de \*HCA.

**Figura 3.** Espectros de FTIR correspondientes a M340: a) antes de la inmersión, b) 2 días, FCS-1,5, c) 4 días, FCS-1,5, d) 7 días, FCS-1,5.



†Señales de sílice y de \*HCA.

**Figura 4.** Espectros de FTIR correspondientes a M480: a) antes de la inmersión, b) 2 días, FCS-1,5, c) 3 días, FCS-1,5, d) 7 días, FCS-1,5.

y a su flexión, a  $598$  y  $566\text{ cm}^{-1}$ , utilizados para identificar HCA. A modo de referencia, se muestran también los espectros de los geles antes de su inmersión. Se identificaron las señales características de la sílice, correspondientes al estiramiento del enlace Si-O-Si, a  $1095\text{ cm}^{-1}$  y su flexión a  $482$

$\text{cm}^{-1}$ . También se distinguió la señal que identifica al grupo Si-OH, a  $950\text{ cm}^{-1}$ , presente en abundancia en la sílice hidratada. Las superficies fueron examinadas por SEM antes y después de su inmersión.

El depósito formado presentó diferencias según la muestra analizada. La muestra M340 presentó la formación previa al depósito de una capa de sílice, presumiblemente formada por disolución y reprecipitación, similar al proceso observado en vidrios bioactivos (Fig. 5). En la muestra M480 el depósito cubrió completamente la estructura porosa original (Fig. 6). El depósito formado presentó las mismas características que el observado en la muestra de VB (Fig. 7).

### Evaluación in vivo

#### Hueso bovino desmineralizado (HDM)

Los fragmentos implantados presentaron un aspecto trabecular definido al microscopio óptico, no existieron signos de reabsorción significativa del material.

Se observó una severa respuesta inflamatoria representada por un importante infiltrado linfoplasmocitario, presencia de células gigantes multinucleadas de cuerpo extraño y macrófagos. Las células inflamatorias se encontraron dispersas entre las trabéculas y los fibroblastos, que formaron una lámina de tejido conectivo denso alrededor de los fragmentos. Se encontraron vasos sanguíneos, pero no signos de neoformación ósea alrededor del implante que indiquen actividad osteoinductiva.

#### Hidroxiapatita (HA)

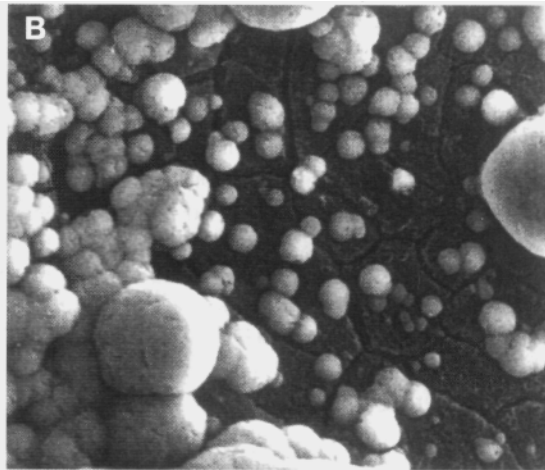
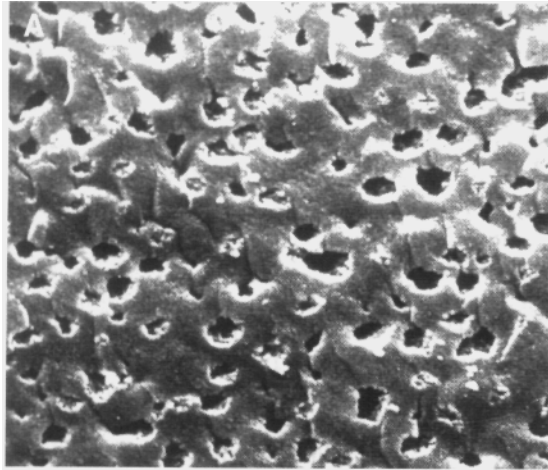
Se observó una respuesta inflamatoria que consideramos leve a moderada alrededor de las partículas de HA, con presencia de un escaso infiltrado linfocitario. Una capa de tejido conectivo fibroblástico separó las partículas del tejido periférico, que presentó fibrosis difusa y vasos sanguíneos. No se distinguió actividad osteoblástica o neoformación ósea vinculadas al implante.

#### Vidrio bioactivo (VB)

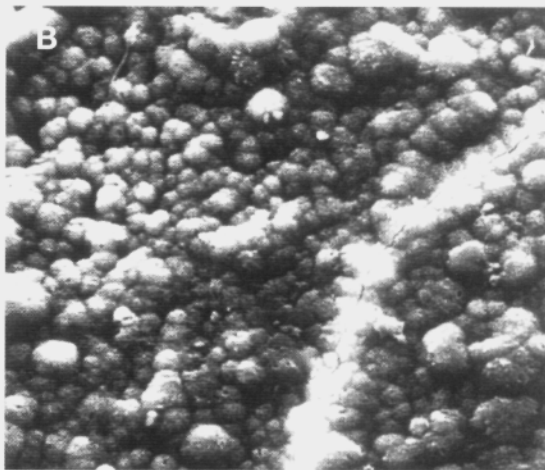
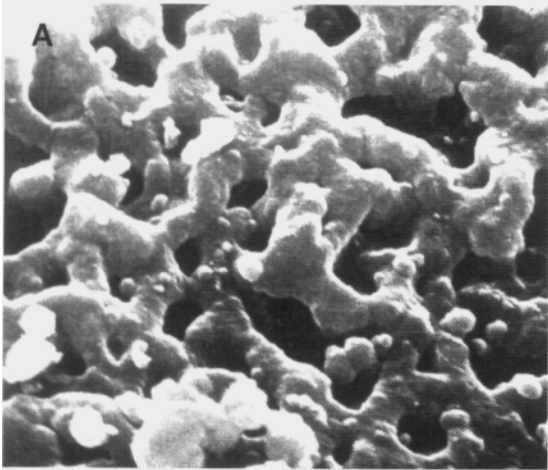
La respuesta inflamatoria provocada por las partículas de vidrio fue mínima, con presencia de muy escasas células inflamatorias. Se formó una cápsula de tejido conectivo densa muy delgada con vascularización evidente en el tejido periférico. No se observaron signos de actividad osteoblástica o de formación de hueso.

#### Geles de sílice

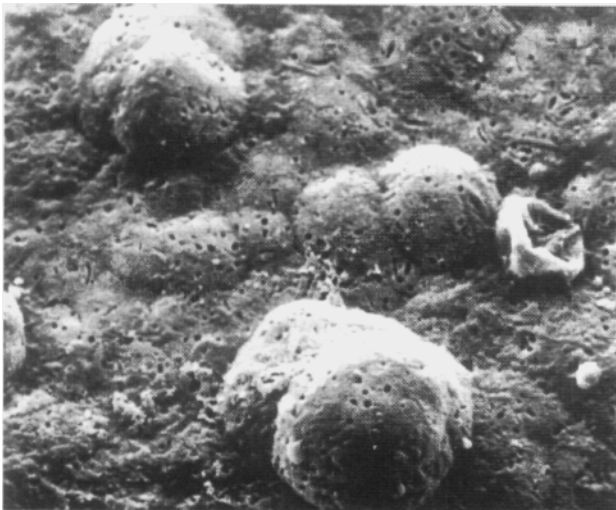
La presencia de las partículas de sílice provocó una respuesta inflamatoria evidente, con formación de un verdadero granuloma inflamatorio con infil-



**Figura 5.** Aspecto superficial de la muestra M340: a) previa al ensayo *in vitro* (5000 x, barra 10  $\mu$ m), b) *in vitro* 1 días, PCS-1,5 (1000 x, barra 10  $\mu$ m).



**Figura 6.** Aspecto superficial de la muestra M480: a) previa al ensayo *in vitro* (5000 x, barra 10  $\mu$ m), b) *in vitro* 1 días, PCS-1,5 (1000 x, barra 10  $\mu$ m).



**Figura 7.** Aspecto superficial de la muestra VB luego de 7 días en PCS.

trado linfoplasmocitario notorio y presencia de histiocitos, pero sin leucocitos polimorfonucleares. Consideramos esta respuesta como moderada a importante según nuestra clasificación. El granuloma estuvo limitado por una pseudocápsula de tejido co-

nectivo denso que lo separó del tejido periférico propio del huésped.

El material quedó incluido en el granuloma, y rodeado por gruesas cápsulas fibrosas formadas alrededor de las partículas o grupos de éstas. No se observaron hueso neoformado ni células óseas en la región.

Los bordes redondeados de las partículas indican que se ha producido disolución del material durante la implantación. Su coloración fue variable, con zonas pardas de distinta intensidad, así como también una sustancia eosinófila amorfa anucleada que cubría parcialmente algunas de las partículas.

### Discusión

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* permiten demostrar la capacidad que presentan algunos de los gels de sílice pura (GSP) de inducir precipitación de HCA sobre su superficie en medios fisiológicos simulados. Este fenómeno parece reforzar la hipótesis de la importancia de la formación o reprecipitación de un gel de sílice sobre la superficie de los vidrios y vitrocerámicos

bioactivos luego de su implantación o de su inmersión en soluciones fisiológicas, como paso previo a la formación de depósitos de HCA.<sup>22</sup> La formación de HCA superficial sobre los geles de sílice es bastante más lenta que sobre los vidrios bioactivos: 3 días como mínimo,<sup>2,14,15</sup> contra algunas horas con los vidrios bioactivos.<sup>7,9</sup> Cabe señalar que en el caso de los vidrios, la formación inicial de una capa superficial de gel de sílice es acompañada por la disolución de iones calcio y fosfato al medio, lo cual favorece la precipitación posterior de HCA.<sup>9</sup>

Con respecto a los ensayos *in vivo*, la validez del modelo subcutáneo utilizado fue comprobada mediante el ensayo de materiales de respuesta subcutánea conocida tales como HDM, HA y VB. Se observó que los resultados presentados en este trabajo coinciden con los comunicados previamente en la bibliografía.<sup>3,28,29</sup>

A partir del análisis histológico de las muestras implantadas en forma subcutánea, es posible determinar que no hubo formación de hueso heterotópico en ninguna de las muestras implantadas, al igual que lo señalado para el ensayo subcutáneo a corto plazo de DBM, HA<sup>3</sup> y vidrios bioactivos.<sup>28</sup> También se destaca la ausencia de osteoblastos en la periferia de las partículas de sílice y la presencia de una sustancia amorfa eosinófila, referida anteriormente por Yamasaki y cols, en su estudio de implantes subcutáneos de hidroxiapatita porosa colocados por períodos de tiempo prolongados. Como ellos, consideramos que este depósito tiene un aspecto similar al de la matriz ósea.<sup>29</sup>

Respecto de la biocompatibilidad de los materiales ensayados, es posible efectuar un análisis sobre la base de la respuesta inflamatoria y de las características de la fibrosis generada. Varios autores señalan que aquellos materiales con respuestas favorables durante la implantación en tejido óseo, generan en el ensayo subcutáneo respuestas inflamatorias mínimas, y cápsulas fibrosas delgadas.<sup>3,9,28</sup> En el presente trabajo los implantes de HA y VB mostraron esta respuesta.

La población celular presente en la periferia de las partículas de HA, vidrio y GSP se podría asociar a una respuesta generada por la presencia de un cuerpo extraño, no-inmunológica, a diferencia de la que se produjo en el caso del HDM, con un infiltrado linfocitario mucho más importante. Este tipo de reacción interferiría con la formación de tejido óseo,<sup>3</sup> esperable sobre la base de las propiedades osteoinductivas del hueso desmineralizado descritas por Urist y cols.<sup>26</sup>

El cambio morfológico de las partículas de GSP observado luego de la implantación y la formación de una capa reprecipitada de sílice sobre al menos una de las muestras (M340, Fig. 5) durante

el ensayo *in vitro* sugieren una significativa disolución del gel estudiado. Esto concuerda con lo informado en la literatura para materiales similares.<sup>11</sup>

La particular respuesta provocada por el GSP, puede estar relacionada con la disolución referida y la liberación de especies potencialmente citotóxicas en el medio circundante.<sup>4</sup> La liberación de especies derivadas de la sílice en el caso del vidrio es considerablemente menor, en parte debido a su menor área de superficie, y quizás, a la más rápida formación de HCA sobre la superficie del vidrio bioactivo, que impediría su posterior disolución.

Los resultados expuestos muestran que a pesar de que algunos GSP son capaces de formar una capa de HCA en forma relativamente rápida sobre la superficie del material, al evaluar su biocompatibilidad *in vivo* provocan respuesta inflamatoria. Es habitualmente aceptado en el campo de los materiales bioactivos que aquellos capaces de formar *in vitro* una capa de HCA exhibirían una biocompatibilidad y bioactividad aceptables al ser implantados *in vivo*.<sup>2,9</sup> Nuestra experiencia indica que si bien esto parece ser cierto para el caso de los vidrios bioactivos, no lo es para los GSP ensayados. El tiempo de formación de la capa de HCA sería un parámetro crítico, para materiales que contienen algún componente soluble con cierto efecto tóxico a partir de determinados niveles de concentración, como los geles evaluados en este trabajo.

Es probable que la reacción inflamatoria de la sílice se desarrolle durante los días previos a la formación del depósito de HCA, lo que sugiere que el valor de los ensayos *in vitro* para predecir el comportamiento *in vivo* de las muestras sería mayor cuanto menores fueran los tiempos de formación de esta capa. Así, aquellos materiales de base silícica capaces de provocar una rápida formación de HCA (vidrios bioactivos y derivados) serían capaces de mostrar *in vivo* una reacción inflamatoria leve, en tanto aquellos que requieran tiempos mayores tendrían mayor probabilidad de actuar como irritantes.

El presente trabajo ha sido desarrollado por un grupo de investigación multidisciplinario integrado por médicos ortopedistas y anatompatólogos, ingenieros y químicos, formado con el objetivo de desarrollar y evaluar nuevos biomateriales, así como también estudiar el comportamiento de materiales utilizados habitualmente en cirugía ortopédica. Actualmente se encuentran en desarrollo otros proyectos relacionados con este tema, que abarcan la síntesis y caracterización de materiales bioactivos y de especies que intervienen en los procesos de mineralización, y la evaluación de los resultados a partir de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Creemos que el desarrollo de este trabajo presenta promisorias perspectivas, debido al interés tanto social como científico de esta área.

## Referencias bibliográficas

1. **Ahola, M; Kortuesuo, P, y Karlsson, S:** The evaluation of biocompatibility and degradation of non-sintered silica xerogel carrier materials *in vivo*. 23<sup>a</sup> Reunión Anual de la Sociedad de Biomateriales; 1997:364.
2. **Andersson, O; Karlsson, K, y Kangasniemi, K:** Calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass *in vivo*. *J Non-Cryst Sol.* 119: 290-296, 1990.
3. **Begley, C,** y cols.: Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials*, 16: 1181-1185, 1995.
4. **Carlisle, EM:** Biochemistry of silicon and related problems. En: *Nobel Symp N° 40 Stockholm Aug.* Londres: Pleumen; 1977:23-26.
5. **Cho, S; Miyagi, F, y Kokubo, T:** Apatite formation on various silica gels in a simulated body fluid containing excessive calcium ion. *J Ceram Soc Japan*, 104: 399-404, 1996.
6. **Fresa, R; Costantini, A, y Buri, A:** Apatite formation on  $(2-x)\text{CaO}\cdot x/3\text{M}_2\text{O}_3\cdot 2\text{SiO}_2$  glasses (M = La, Y;  $0 < x < 0.6$ ) in a stimulated body fluid. *Biomaterials*, 16: 849-854, 1995.
7. **Galliano, P:** *Vidrios y vitrocerámicos bioactivos de silicofosfatos alcalinotérreos*. Tesis, Universidad de Mar del Plata, Buenos Aires. Argentina; 1995.
8. **Gwynn, P:** Cell biology at interfaces. *J Mat Sci: Mat Med*, 5: 357-360, 1994.
9. **Hench, L:** Bioceramics: From concept to clinic. *J Am Ceram Soc*, 74(6): 1487-1510, 1991.
10. **Hoogendoorn, H; Renooij, W, y Akkermans, L:** Long-term study of large ceramic implants (porous hydroxyapatite) in dog femora. *Clin Onhop Rel Res*, 187: 281-288, 1984.
11. **Hunter, A; Archer, C,** y cols.: Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts o biomaterials for orthopaedic use. *Biomaterials*. 16: 287-295, 1995.
12. **Kurashina, K; Kurita, H, y Takeuchi, H:** Osteogenesis in muscle with composite graft of hydroxyapatite and autogenous calvarial periosteum: a preliminary report. *Biomaterials*, 16: 119-123, 1995.
13. **Lewandrowski, K; Venugopalan, V, y Tomford, W:** Kinetics of cortical bone demineralization: Controlled demineralization -a new method for modifying cortical bone allografts. *J Biomed Mat Res*, 31: 365-372, 1996.
14. **Li, P; Ohtswki, C, y Kokubo, T:** Apatite formation induced by silica gel in a stimulated body fluid. *J Am Ceram Soc*, 75: 2094-2097, 1992.
15. **Li, P,** y cols.: Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel. *J Mat Sci: Mat Med*, 4: 127-131, 1993.
16. **Li, P:** *In vitro* and *in vivo* calcium phosphate induction on gel oxides. Tesis, Universidad de Leiden; 1993:81.
17. **Mann, S:** Biomaterialization and biomimetic materials chemistry. *J Mater Chem*. 5: 935-946, 1995.
18. **Nakanishi, K:** Studies on morphology control of porous silica through polymer-incorporated sol-gel processes. Tesis, Universidad de Kyoto, Kyoto, Japón; 1991.
19. **Neo, M; Voight, C, y Herbst, H:** Analysis of osteoblast activity at biomaterial-bone interfase by *in situ* hybridization. *J Biomed Mat Res*. 30:485-492, 1996.
20. **Nolan, PC; Templeton, P; Molán, RAB, y Wilson, DJ:** Osteoinductive potential of human demineralised bone and a bioceramic in the abdominal musculature of the rat. *J Anat*, 174: 97-102, 1991.
21. **Ohgushi, H; Goldberg, VM, y Kaplan, AI:** Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Onhop Res*, 7: 568-578, 1989.
22. **Pereira, M; Clark, A, y Hench, L:** Effect of the texture on the rate of hydroxyapatite formation on gel-silica surface. *J Am Ceram Soc*, 78(9): 2463-2468, 1995.
23. **Picha, G, y Drake, R:** Pillared-surface microstructure and soft-tissue implants: Effect of implant site and fixation. *J. Biomed Mat Res*. 30: 305-312, 1996.
24. **Tanizawa, Y, y Suzuki, T:** Effects of silicate ions on the formation and transformation of calcium phosphates in neutral aqueous solutions. *J Chem Soc Faraday Trans*, 91: 3499-3503, 1995.
25. **Urist, M; O'Connor, B, y Burwell, G:** *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes*. Butterworth-Heinemann, Ltd.; 1994:68.
26. **Urist, M; O'Connor, B, y Burwell, G:** *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes*. Butterworth-Heinemann, Ltd.; 1994:49:145. 220.
27. **Urist, M; O'Connor, B, y Burwell, G:** *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes*. Butterworth-Heinemann, Ltd.; 1994:319.
28. **Wilson, J, y Noletti, D:** Bonding of soft tissues to Bioglass®. En: **Yamamuro, H,** ed. *Handbook of Bioactive Ceramics. Vol. I. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics*. CRC Press; 1990:283-302.
29. **Yamasaki, H, y Sakai, H:** Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials*, 13: 308-312. 1992.
30. **Zimmermann, B; Wachtel, H, y Noppe, C:** Patterns of mineralization *in vitro*. *Cell Tissue Res*, 263: 483-493, 1992.