

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



BIOMATERIALES METÁLICOS ENDOPROTÉSICOS:
BIOCOMPATIBILIDAD Y BIODEGRADACIÓN

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

OSCAR GARCÍA BODELÓN

Bajo la dirección de las doctoras:

María Lorenza Escudero Rincón

María Cristina García Alonso

Madrid, 2015

RESUMEN

Los materiales de osteosíntesis temporales biodegradables deben mantener sus características mecánicas hasta que el cuerpo repare el daño producido. Después deben degradarse y reabsorberse de forma paulatina sin producir efectos adversos, ni locales ni sistémicos, en el organismo. Así se evita una nueva intervención quirúrgica para retirar el material de osteosíntesis. En este contexto, el objetivo de este trabajo de investigación ha consistido en estudiar biomateriales metálicos endoprótesiscos de base magnesio. La evaluación de las propiedades físicas y mecánicas y el control de la velocidad de degradación ha sido el objeto de los primeros estudios de este trabajo que se realizaron *in vitro*. Para ello se ensayaron diferentes materiales: Mg colado, Mg pulvimetalúrgico y la aleación AZ31, tanto en estado de recepción como modificados mediante un tratamiento en ácido fluorhídrico, que genera un recubrimiento de fluoruro de magnesio. También se ha comprobado la biocompatibilidad de dichos materiales en cultivos celulares. Tras estos estudios se ha confirmado que la aleación AZ31 muestra unas propiedades mecánicas adecuadas para la osteosíntesis de huesos, además de un excelente comportamiento frente a la corrosión y compatibilidad en cultivo con líneas celulares de pre-osteoblastos y fibroblastos cuando presenta el recubrimiento de fluoruro de magnesio sobre su superficie. El material seleccionado en base a la caracterización *in vitro* fue la aleación AZ31, por ser el material con mejores propiedades mecánicas y de resistencia a la corrosión en medios fisiológicos. Con este material se realizaron los posteriores ensayos *in vivo*.

La aleación AZ31 ha sido ensayada como varilla intramedular en fémures de ratas Wistar. La experimentación *in vivo* se llevó a cabo según un diseño experimental donde los parámetros de estudio fueron los siguientes: el tiempo de

permanencia de la varilla (de 0 a 13 meses), la presencia o no de fractura ósea y que la aleación AZ31 no presentase recubrimiento o tuviese una capa de fluoruro de magnesio. Se ha llevado a cabo el estudio de su biodegradación mediante tomografía y estudios histológicos e histomorfométricos. También se ha evaluado la respuesta sistémica, mediante el análisis de trazas metálicas acumuladas en distintos órganos (riñón, hígado, pulmones, bazo y cerebro), analizadas por ICP-MS (Mg, Al, Zn y Mn) y por electrodo selectivo (F), así como su posible toxicidad en función de esta cuantificación. Estas trazas derivan del proceso de biodegradación de la aleación AZ31 al ser insertada *in vivo* como varilla intramedular. La respuesta local y la biocompatibilidad al insertar la aleación AZ31, con y sin recubrimiento de fluoruro de magnesio, han sido satisfactorias, ya que la aleación AZ31 ha sido capaz de mantener sus propiedades mecánicas y su resistencia a la corrosión el tiempo suficiente como para permitir la reducción de la fracturas en los animales experimentales. El gas producido en el proceso de biodegradación de la aleación AZ31 se intercambia y difunde a través de los tejidos circundantes, no alterando la formación ni la morfología del callo óseo.

La cuantificación de las trazas metálicas en los distintos órganos, derivadas de la biodegradación de la aleación AZ31, permite evidenciar que factores como la fractura o el tratamiento de conversión química de la aleación AZ31 no influyen en la acumulación de dichas trazas en los distintos órganos.

El elemento químico de mayor interés desde el punto de vista toxicológico fue el Al. Los resultados han sido favorables al empleo endomedular de esta aleación, pues solamente el 3,95 % del Al contenido en el implante original se depositó en los órganos estudiados tras 13 meses desde su inserción. La

acumulación del Al en el cerebro no es estadísticamente significativa, a diferencia del resto de los órganos, donde el incremento sí lo es.

La respuesta local, sistémica y toxicológica a la inserción de estos implantes permite afirmar que en el diseño animal planteado, la aleación de magnesio AZ31 puede ser usada como material de osteosíntesis.

Por último, las concentraciones sistémicas de trazas metálicas procedentes del proceso de biodegradación de la aleación AZ31, no alcanzan niveles susceptibles de ser considerados tóxicos en el modelo animal planteado.

ABSTRACT

The ideal biomaterials used as temporary implants should offer enough mechanical support during the healing of the fracture and then to be biodegraded and resorbed by metabolic mechanisms without causing any toxic effect, neither local nor systemic. So, a new surgical operation to remove the remaining material is avoided. In this context the aim of this research has been to study Mg-based biomaterials as endoprosthetic implants. Preliminary *in vitro* studies were carried out in order to evaluate physical and mechanical properties. To that end, several materials were tested: cast Mg, powder-metallurgical Mg and AZ31 Mg alloy, in both as received condition and modified with a conversion treatment using a HF solution, which gives rise to a magnesium fluoride layer.

After these studies, results has stated that AZ31 alloy, when its surface is protected with the magnesium fluoride layer, offers mechanical properties suitable for bone osteosynthesis, in addition to an excellent behaviour against corrosion. Biocompatibility of surface modified AZ31 materials in cell culture was also tested showing a good compatibility with pre-osteoblast and fibroblast cell lines. From the results of the *in vitro* characterization, the AZ31 alloy was chosen due to both superior mechanical properties and corrosion resistance in body fluids. With this material subsequent *in vivo* assays were performed.

AZ31 alloy has been tested as intramedullary pin in Wistar rat femora. The *in vivo* study was carried out following an experimental design in which study parameters were: experimentation time (from 1 to 13 months), fracture presence or not and AZ31 implants with and without Mg fluoride coating.

Biodegradation was monitored by means of computed tomography, and histological and histomorphometric analysis. Systemic response has been also assessed through the analysis of metal traces accumulated in different organs

(kidney, liver, lungs, spleen and brain) by ICP-MS (Mg, Al, Zn y Mn) and by ion-selective electrode (F), as well as its potential toxicity according to this quantification. These traces are the result of AZ31 biodegradation process, when it is inserted *in vivo* as intramedullary pin. Local response and biocompatibility after AZ31 alloy insertion, with or without Mg fluoride coating, has been satisfactory, since AZ31 alloy has been able to maintain its mechanical properties and corrosion resistance long enough time to allow fracture healing in experimental animals.

Produced gas during biodegradation process disappears with time as a result of the diffusion process through soft tissues, not altering formation nor callus morphology.

Measurement of metal traces at the different organs, derived from AZ31 alloy biodegradation, provides evidence about some factors, such as fracture or chemical conversion treatment, do not affect metal traces accumulation on the studied organs.

The most interesting element from the toxicological point of view was Al. Only 3.95% of the whole Al present in the original implant was recovered in the studied organs after 13 months from its insertion. Al accumulation in brain is not statistically significant unlike all other organs, where it is.

Local, systemic and toxicological response to AZ31 implant insertion brought us to the conclusion that, in the animal model proposed, AZ31 alloy may be used as an osteosynthesis material.

Finally, systemic amount of metal traces released by AZ31 biodegradation process do not reach levels that are subject to being considered toxic in the animal model proposed.

AGRADECIMIENTOS

En el ámbito profesional:

A mis Directoras, María Lorenza Escudero y Cristina García, sin cuyo esfuerzo, dedicación, entusiasmo y empuje esta Tesis no habría sido posible.

A mi Tutora del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I de la UCM, María Teresa Portolés, y a los demás integrantes del grupo BIOUCM por su orientación y sus acertados consejos.

Al Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM-CSIC) por el apoyo institucional que me han otorgado.

A cuantos han revisado, comentado, sugerido modificaciones, han realizado análisis y aportado datos para la elaboración de esta Tesis. En particular a la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares, al grupo BIOCIB del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), a la Facultad de Informática de la Universidad Rey Juan Carlos I y al Centro de Apoyo a la Investigación de RMN y RSE de la Universidad Complutense de Madrid.

En el ámbito personal:

A Sara, que me subió a la cima de una montaña y juntos desde allí vimos girar el mundo. Por tantas cosas que me enseñó; entre ellas que lo imposible se torna en superable sólo con decidir intentarlo y enseguida se convierte en fácil cuando se trabaja en equipo como si dos fueran uno. Que sonriendo, la subida es la misma, pero parece menor. Y que a veces el descenso es la parte más dolorosa.

A su familia, por acogerme con tanta naturalidad y hacerme sentir uno más.

A Marga Costa (*in memoriam*) porque ella plantó la semilla, probablemente mientras caminábamos por uno de sus hayedos.

A Pilar Bodelón, quién estando tan lejos, quiso y supo ser la más cercana.

A Jesús Alonso, que ha tenido la rara virtud en un jefe de dejarme crecer, sin necesidad de preguntar, de dirigir ni de limitar.

A la muy extensa y diversa familia de los “Compañeros del metal”, embarcados todos en el mismo navío y que me regalaron la faceta humana de esta singladura. Resultaron en ocasiones áncora o galerna, pero las más de las veces fueron el viento en las velas, el rumoroso oleaje en la quilla, brújula en el puente, barril de ron al caer el sol y seguro fondeadero donde capear la tempestad. En el rol de tripulación, arribados desde puertos de los siete mares, han figurado: Alejandro, Ángela, Antonio, Amir, Belén, Blanca, Carla, Cristina, Dani, David, Diana, Edgar, Emilio, Esther, Fede, Fernando, Heidy, Irene, Iván,

Jesús, Joaquín, Juan Carlos, Laura, Lucía, Manuel, María Criado, María Lorenza, Maritxu, Mónica, Paulina, Rodrigo, Santi, Tere y Violeta. Muchos navegan ahora en otros derroteros, pero en mí permanece su recuerdo. Os deseo buen rumbo.

A los compañeros del Instituto del Frío que, al margen del trabajo, encontraron algo de tiempo y ganas para charlar, discutir, reír y soñar con la Ciencia y con la Vida... esto es, para ser además amigos: Sara, Jesús, Miguel Angel, Helena, Paquita, Lucía, Rosa, M^a Carmen, Inés, Carlos...

A Carmen Iglesias, aventajada compañera en esta aventura.

A la Vida, para que me perdone el tiempo invertido en esta Tesis.

En Madrid, Marzo de 2015

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	01
1.1 EL TEJIDO ÓSEO.....	03
1.1.1 <i>Principales tipos celulares del tejido óseo.....</i>	05
1.1.2 <i>Propiedades mecánicas del hueso.....</i>	07
1.2 BIOMATERIALES Y CLASIFICACIÓN.....	09
1.2.1 <i>Clasificación en cuanto a su naturaleza.....</i>	12
1.2.2 <i>Materiales metálicos.....</i>	16
1.3 REQUISITOS QUE DEBE CUMPLIR UN BIOMATERIAL.....	20
1.3.1 <i>Propiedades mecánicas.....</i>	20
1.3.2 <i>Biocompatibilidad.....</i>	24
1.3.3 <i>Biodegradación.....</i>	21
1.4 BIOMATERIALES METÁLICOS EN LA REDUCCIÓN DE FRACTURAS.....	23
1.5 IMPLANTES METÁLICOS BIODEGRADABLES: EL MAGNESIO Y SUS ALEACIONES.....	27
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1 MATERIALES.....	41
3.1.1 <i>Composición.....</i>	41
3.1.2 <i>Microestructura.....</i>	42
3.1.3 <i>Comportamiento mecánico.....</i>	43
3.1.4 <i>Modificación superficial.....</i>	43

3.1.5	<i>Ensayos de corrosión</i>	44
3.2	ENSAYOS EN CULTIVOS CELULARES	46
3.2.1	<i>Cultivo celular</i>	46
3.2.2	<i>Crecimiento celular</i>	47
3.2.3	<i>Viabilidad celular</i>	47
3.3	ENSAYOS IN VIVO	48
3.3.1	<i>Diseño experimental</i>	48
3.3.2	<i>Tomografía computarizada</i>	50
3.3.3	<i>Análisis histológico e histomorfométrico</i>	53
3.3.4	<i>Extracción y tratamiento de los órganos</i>	55
3.3.5	<i>Análisis de trazas mediante ICP-MS</i>	56
3.3.6	<i>Análisis de flúor mediante electrodo selectivo</i>	57
3.4	ESTADÍSTICA	58
4.	RESULTADOS	59
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES DE BASE MAGNESIO	61
4.1.1	<i>Microestructuras</i>	61
4.1.2	<i>Comportamiento mecánico</i>	63
4.1.3	<i>Caracterización superficial</i>	64
4.1.4	<i>Corrosión de los materiales de Mg en estado de recepción y con recubrimiento de MgF₂</i>	68
4.2	ENSAYO DE BIOCOMPATIBILIDAD EN CULTIVO CELULAR	76
4.3	EFFECTOS LOCALES DE LA CORROSIÓN DEL IMPLANTE	79
4.3.1	<i>Estudio de biodegradación del implante y reparación del hueso mediante técnicas no invasivas</i>	79
4.3.2	<i>Evolución de la biodegradación del implante y reparación del hueso mediante histología e histomorfometría</i>	89
4.4	EFFECTOS SISTÉMICOS DE LA CORROSIÓN DEL IMPLANTE	100

5. DISCUSIÓN	107
5.1 CARACTERIZACIÓN Y BIOCOMPATIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LOS MATERIALES DE BASE MAGNESIO	109
5.2 BIOCORROSIÓN IN VIVO DE LA ALEACIÓN AZ31	111
5.2.1 <i>Estudio de los efectos locales de la biocorrosión del implante de AZ31</i>	112
5.2.2 <i>Estudio de los efectos sistémicos de la biocorrosión del implante de AZ31</i>	119
6. CONCLUSIONES	131
7. BIBLIOGRAFÍA	135

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL TEJIDO ÓSEO

El hueso es un tejido duro, vascularizado y dinámico, que cumple funciones vitales en los vertebrados como ser el principal componente del esqueleto, sustentar el peso corporal, permitir la locomoción, proteger órganos vitales, servir de anclaje para los músculos, transmitir el sonido, almacenar sales y minerales esenciales para el metabolismo, y soportar grandes cargas cíclicas.

Dependiendo de parámetros como la localización en el organismo o la edad del individuo, el hueso tiene forma, estructura y propiedades muy diferentes, pero con ciertas características comunes a todos ellos, como estar compuesto por minerales, proteínas, agua, células y otras macromoléculas que dan lugar a una estructura muy compleja.

El hueso está formado por una fase inorgánica y otra orgánica. La fase inorgánica o mineral (60-70% del peso) está formada por placas cristalinas de hidroxiapatita cálcica $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, encargada de dar resistencia y dureza al hueso [1]. La fase orgánica (20-40%) está compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo I (90%) [2], junto con una matriz de proteoglicanos, glicoproteínas y ácido γ -carboxiglutámico, responsable de la organización estructural, donde se hallan inmersas las células óseas. El hueso contiene además entre un 5 y un 8% de agua.

Todos los huesos están formados por dos estructuras arquitectónicas básicas [3]: hueso cortical (compacto) y hueso esponjoso (trabecular), con formas y propiedades mecánicas distintas. El hueso cortical es de 10 a 20 veces más rígido que el hueso esponjoso. Este último se caracteriza por una porosidad interconectada de entre un 50 y un 90%.

El hueso cortical se encuentra en la parte superficial de los huesos y es

homogéneo macroscópicamente. Su grosor varía de acuerdo al segmento de la diáfisis o zona entre los extremos del hueso y según su localización en el esqueleto. Es el que soporta las cargas, fuerzas de torsión y de compresión [4].

El hueso esponjoso se encuentra principalmente en la epífisis, es decir, en los extremos de los huesos largos, pero también se encuentra en huesos cuboides, como las vértebras. Deja espacios entre sus láminas, que son ocupados por la médula ósea.

Según el grado de madurez, el tejido óseo se clasifica en fibrilar (o primario) y laminar (o secundario) [5]. El hueso fibrilar está considerado como un hueso inmaduro o primitivo y normalmente se encuentra en los embriones y recién nacidos, en los callos formados en el período de remodelación después de una fractura y en la región de la metáfisis de los huesos en crecimiento. Este tipo de huesos tiene fibras gruesas que no están orientadas uniformemente. Tiene más células por unidad de volumen que el hueso laminar, su contenido mineral varía y las células están dispersas al azar. El hecho de que las fibras de colágeno estén desorientadas le confiere a este tipo de hueso isotropía con respecto a las características mecánicas del tejido.

El hueso laminar se comienza a formar un mes después del nacimiento, por lo que este tipo de hueso es más maduro que el fibrilar y de hecho se forma a partir del proceso de remodelación del hueso inmaduro. El hueso laminar se encuentra a lo largo del esqueleto tanto en el hueso esponjoso como en el cortical. Al contrario del tipo anterior, en el hueso laminar las fibras de colágeno están altamente organizadas y orientadas, lo cual le confiere propiedades anisotrópicas, es decir, el comportamiento mecánico de esta clase de hueso varía dependiendo de la orientación de las fuerzas aplicadas, teniendo la mayor

resistencia en dirección paralela al eje longitudinal de las fibras de colágeno. En la Figura 1.1.1 se muestra la estructura típica de un fémur.

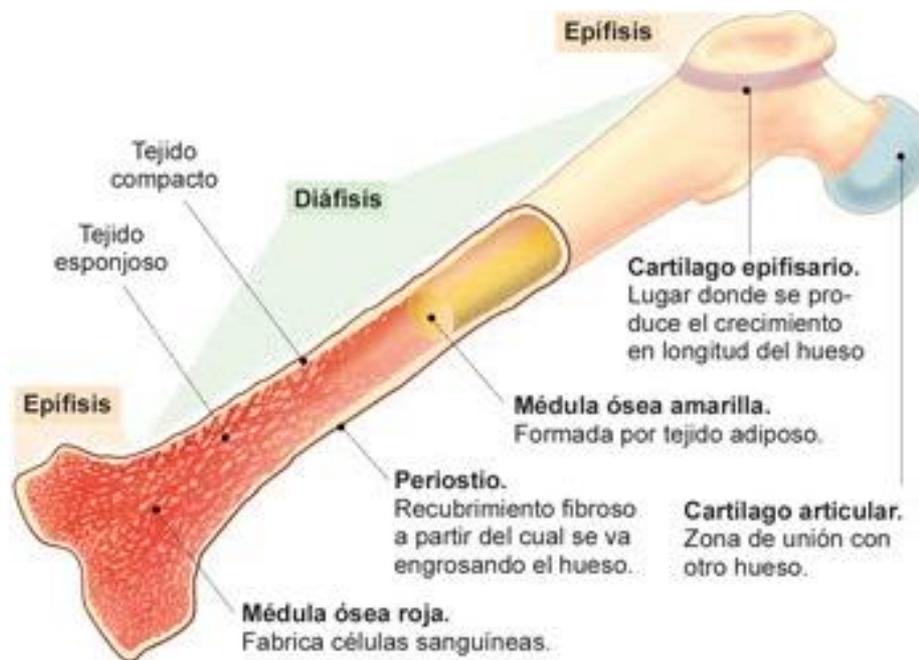


Figura 1.1.1 Estructura típica de un fémur.

1.1.1 Principales tipos celulares del tejido óseo

Los osteoblastos son las células responsables de la formación de tejido óseo. Proviene de las células progenitoras mesenquimales no hematopoyéticas de la médula. Este tipo de células produce colágeno de tipo I y osteocalcina, entre otras proteínas, dando lugar al osteoide o matriz ósea. Los osteoblastos se caracterizan por ser células polarizadas, es decir, su núcleo se encuentra en el extremo de la célula. Están localizados particularmente en el periosteo, una membrana que envuelve la parte externa de los huesos medianos y grandes y en la membrana endosteal, la cual se desarrolla sobre la pared interna del canal medular.

Una vez que los osteoblastos han alcanzado el final de su actividad y la matriz ósea se mineraliza, se convierten en osteocitos. Estas células se caracterizan por tener una relación núcleo/citoplasma mucho mayor que los osteoblastos, debido a que contienen menos orgánulos.

Los osteocitos se hallan orientados uniformemente con respecto a los ejes longitudinal y radial de las laminillas que lo conforman. Son alimentados por vía linfática con los líquidos fisiológicos presentes dentro del hueso y establecen comunicación con los osteocitos adyacentes por medio de uniones comunicantes.

Una de las funciones más importantes de los osteocitos es mantener constante el equilibrio entre la fracción mineral y la orgánica. Además favorecen, por medio de sus canales, el intercambio de materiales entre fluidos, tejidos y la matriz, manteniendo al hueso como un tejido vivo.

Los osteoclastos son los principales intervinientes en la reabsorción ósea. Se caracterizan por ser células de gran tamaño (20 a 100 μm de diámetro) y con múltiples núcleos. Los osteoclastos derivan de células pluripotenciales de la médula ósea, las cuales también dan origen a células del sistema inmune como los monocitos y macrófagos. Se encuentran en regiones de reabsorción ósea llamadas lagunas de Howship. Estas células se unen a la superficie del hueso mediante proteínas encargadas de la unión celular llamadas integrinas, aíslan la zona del hueso a la cual se han unido y disminuyen el pH localmente mediante la producción de protones a través del sistema de la anhidrasa carbónica. El bajo pH incrementa la solubilidad de los cristales de hidroxapatita, y una vez que la fase mineral ha sido eliminada, los componentes orgánicos de la matriz son hidrolizados por medio de digestión proteolítica.

1.1.2 Propiedades mecánicas del hueso

El sistema esquelético soporta cargas de diferentes tipos (compresivas, de tracción y de cizalladura) debido a las diversas actividades del individuo [6].

Las propiedades elásticas del hueso cortical humano cuando se aplica carga en el plano transversal al eje longitudinal, son aproximadamente isotrópicas y a su vez son substancialmente diferentes a aquellas obtenidas al aplicar cargas en la dirección longitudinal, la cual es paralela al eje de las osteonas (a lo largo del eje longitudinal de la diáfisis). Por lo tanto, el hueso cortical humano es considerado como un material ortotrópico [7].

En el caso de la resistencia mecánica del hueso, ésta depende también de la dirección en la cual es cargado el hueso. Al igual que en el caso anterior, se considera como un material ortotrópico. La resistencia mecánica depende así mismo de si el hueso es cargado a flexión, compresión o tracción. Por todo esto, no es posible especificar la resistencia o las propiedades elásticas del hueso cortical con un único valor.

Además de la anisotropía del hueso ya mencionada, el hueso presenta un comportamiento viscoelástico, ya que sus propiedades mecánicas son sensibles tanto a la velocidad de deformación como al tiempo de aplicación de la carga.

En cuanto a las propiedades del hueso trabecular, no han sido estudiadas con la profundidad con la que lo han sido las del hueso cortical. Las propiedades de este tipo de hueso dependen altamente de la densidad del mismo [8]. Una comparativa entre las principales propiedades mecánicas de estos tipos de hueso se muestra en la Tabla 1.1.1.

Propiedad	Hueso cortical longitudinal	Hueso cortical transversal	Hueso medular
Resistencia a la tracción (MPa)	80-151	51-56	10-20
Resistencia a la compresión (MPa)	130-220	100-130	2-12
Módulo de Young (GPa)	17-20	6-13	0,1–0,5

Tabla 1.1.1 Propiedades mecánicas del hueso (modificado de [9] y [10]).

El hueso es uno de los pocos tejidos humanos adultos capaz de regenerarse en respuesta a un daño. Ahora bien, no es capaz de conseguirlo por sí mismo cuando existe una distancia superior a 1 mm entre las dos zonas de hueso contiguas dañadas [4]. Por ello, a la hora de efectuar grandes reparaciones en el tejido óseo dañado, la opción ideal es un injerto.

Para que un implante se integre adecuadamente en el hueso donde se inserta, el material ideal debería ser osteoconductor, que permita la adhesión y proliferación de osteoblastos; osteoinductor, capaz de inducir la diferenciación de pre-osteoblastos a osteoblastos y estos a osteocitos, creando hueso maduro; y osteogénico, que promueva la formación de nuevo hueso a partir de células que han sido sembradas sobre él *in vitro* [11] [12].

El origen óptimo de este tipo de injerto o implante es el autotransplante, generalmente obtenido de la cresta ilíaca. Sin embargo, esta fuente tiene sus limitaciones, como son la cantidad disponible y los efectos secundarios o asociados a la intervención. Por otra parte, la utilización de material alógeno (de cadáveres o de donantes vivos) presenta riesgos de transmisión de enfermedades, rechazo inmune o pérdida de propiedades mecánicas asociadas

a los procesos de esterilización.

Para solventar estas dificultades, se ha invertido gran esfuerzo en desarrollar alternativas capaces de restaurar el tejido óseo. Así, un gran número de materiales sintéticos o biomateriales se han diseñado y probado con este fin.

1.2 BIOMATERIALES Y CLASIFICACIÓN

La primera definición de biomaterial fue acordada en 1986 en la Conferencia de la Sociedad Internacional de Biomateriales celebrada en Chester (Reino Unido) como: “un material no vivo utilizado en un aparato médico y concebido para interactuar con sistemas biológicos” [13]. Posteriormente se ha definido como “un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos, para evaluar, tratar, aumentar o substituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” [14] o también como “aquel material de origen natural o sintético que se utiliza para dirigir, suplementar o reemplazar alguna función de un tejido vivo” [15] o incluso como “una sustancia sistémica y farmacológicamente inerte diseñada para su implantación dentro de un sistema vivo o su incorporación a éste” [16]. La definición que por su mayor amplitud considero que engloba mejor al ámbito de los biomateriales, en constante evolución, es la propuesta por el Instituto de la Salud de los Estados Unidos: “Biomaterial es cualquier sustancia o combinación de sustancias de origen natural o artificial, que puede ser usada durante cierto tiempo como un todo o como parte de un sistema y que permite tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo”.

El uso de biomateriales en seres humanos se remonta al antiguo Egipto, encontrándose suturas de hilos de lino en heridas y placas de oro para reparar

defectos del paladar. Al inicio de nuestra Era, se utilizaban ocasionalmente por las principales culturas del momento: romanos, chinos y aztecas [17] y en los siguientes siglos se emplearon materiales de distinta naturaleza, como cerámicos (ojos de vidrio), poliméricos (dientes de madera) y metálicos, como los ilustrados en la Figura 1:



Figura 1.1.1 Ejemplo de biomateriales empleados en la Antigüedad

Atendiendo a los biomateriales utilizados en el aparato locomotor, a finales de los años sesenta del siglo XX, Brånemark [18] demostró que era posible el contacto directo (sin interposición de tejido blando) entre el hueso y la superficie de un implante y definió la oseointegración como una conexión directa estructural y funcional entre el hueso vivo y la superficie de un implante sometido a carga funcional.

Los primeros materiales empleados, a partir de 1930, conocidos como tolerables, que producen una reacción a cuerpo extraño mínima, fueron los materiales metálicos como el acero inoxidable y las aleaciones de cobalto-cromo (CoCr).

La primera generación de biomateriales, entre los años 1950-1980, eran materiales bioinertes, que producían la mínima respuesta por parte del tejido vivo. El ejemplo clásico es la alúmina (Al_2O_3).

Posteriormente, surgieron los biomateriales de la segunda generación entre los años 1980-2000, con la tendencia contraria, desarrollar materiales bioactivos que reaccionaran de forma controlada con el tejido vivo, buscando la estimulación de diferentes respuestas celulares a partir de las características superficiales de los mismos como los vidrios de silicio, la hidroxiapatita y los polímeros biodegradables.

Finalmente, a partir del año 2000 nos encontramos en la tercera generación de biomateriales, conocida como ingeniería de tejidos. En ella, tejidos e incluso órganos completos son creados *in vitro* para ser posteriormente insertados *in vivo* y combinan propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material. Su función es, por tanto, temporal, ya que el material debe reabsorberse una vez restablecida la función del tejido.

El momento actual se caracteriza por el auge en el desarrollo de nanobiomateriales y el gran desarrollo de la ingeniería de tejidos.

Dependiendo del tiempo que deben permanecer en el cuerpo humano, los implantes pueden ser clasificados en permanentes y temporales. Son permanentes aquellos que teóricamente deberían permanecer en el interior del organismo durante toda la vida de éste, aunque en la realidad tienen un periodo de vida útil de 15 a 20 años. Este tipo de materiales tienen la función reemplazar tejidos u órganos dañados. Es el caso de las prótesis de rodilla, cadera o implantes dentales. Por otro lado, los implantes temporales, están diseñados para que, una vez concluida su función, puedan ser retirados mediante cirugía o,

mejor aún, desaparecer por sí mismos sin dejar rastro en el organismo.

Centrándonos en los implantes temporales, Kulkarni et al. [19, 20] introdujeron en los años 60, el concepto de material bioabsorbible y en las dos últimas décadas se han utilizado implantes de este tipo en muchos campos de la cirugía ortopédica, incluyendo la fijación de fracturas, reemplazo óseo, reparación de hombro, cartílago y menisco, fijación de ligamentos y liberación de fármacos. Estos materiales se han utilizado en forma de tornillos, clavos, y placas para cirugía ortopédica, oral y craneofacial [21, 22]. Ahora bien, existe una característica primordial que deben presentar los materiales biodegradables y bioabsorbibles, además de las básicas de cualquier implante: los subproductos de su degradación no han de ser mutagénicos, carcinogénicos, antigénicos o tóxicos.

1.2.1 Clasificación en cuanto a su naturaleza

Existen dos grandes grupos de biomateriales, los materiales orgánicos, objeto típico de la ingeniería de tejidos y los inorgánicos, que incluyen cerámicos, poliméricos, metálicos y materiales compuestos. Estos últimos están constituidos al menos por dos de los materiales anteriormente citados; por ejemplo, un material metálico con refuerzo polimérico.

Los materiales orgánicos, actualmente asociados a la ingeniería de tejidos, fundamentan una de las áreas con más potencial dentro de la medicina regenerativa. El desarrollo e implementación de este área de conocimiento conllevaría la disminución de gran parte de la problemática tradicional aún sin resolver, como las intervenciones costosas y dolorosas para la extracción del implante, la disponibilidad de donantes y las reacciones de rechazo y el riesgo

de transmisión de enfermedades infecciosas en el caso de los aloinjertos y los xenoinjertos.

La ingeniería de tejidos se basa en la utilización de biomateriales con las características mencionadas para los materiales de tercera generación, es decir, bioactivos y bioabsorbibles, capaces de estimular la respuesta celular y molecular de forma controlada, para que actúen como soportes temporales en la reparación de defectos óseos. Además de los biomateriales en sí, pueden emplearse células, factores o combinaciones de ellos [34].

Dentro de este área existen dos tendencias principales: la primera consiste en el desarrollo de andamios tridimensionales acelulares, que una vez implantados *in vivo*, servirán para alojar las diferentes células. En la segunda tendencia se desarrollan andamios tridimensionales, sembrados con las células progenitoras bajo condiciones *in vitro* y posteriormente son implantados en el paciente para reemplazar el tejido dañado. Una variante de esta última es la creación *in vitro* de órganos completamente funcionales, que luego serán transplantados [35].

Aunque es indudable el potencial de la Ingeniería de tejidos, en el momento actual se encuentra en una fase muy temprana, prácticamente reducida al nivel de experimentación *in vitro*. Por esta razón, se mantiene plenamente vigente la investigación en paralelo sobre la mejora de biomateriales inorgánicos, que ya han demostrado su capacidad *in vivo*.

En la tabla 1.2.1 se resumen los principales grupos de biomateriales inorgánicos y su aplicación más usual. La conjunción de biomateriales pertenecientes a dos o más de estos grupos, da lugar a los materiales compuestos.

Material	Empleo más común
Cerámicos	
Alúmina (Al_2O_3)	Superficie de contacto en artroplastia de articulaciones
Circonia (ZrO_2)	Superficie de contacto en artroplastia de articulaciones
Poliméricos	
Polimetilmetacrilato (PMMA)	Cementos óseos
Polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE)	Superficie de contacto de baja fricción
Metálicos	
Ti6Al4V	Implantes no sometidos a deslizamiento, como vástago de prótesis
Co-Cr-Mo	Componente de la articulación en artroplastia
Aceros inoxidables	Componentes en artroplastia. Tornillos, placas, etc.

Tabla 1.2.1 Biomateriales inorgánicos habitualmente empleados hoy en día.

Los materiales cerámicos se emplean especialmente en aplicaciones odontológicas y ortopédicas. Los ejemplos más típicos son la alúmina, la circonia, los fosfatos cálcicos y ciertos tipos de vidrios. Presentan altas temperaturas de fusión, baja conductividad eléctrica y calorífica y son duros y frágiles, con baja resistencia a la tracción.

Los de primera generación son considerados en general como bioinertes, empleados desde la década de los 60 (alúmina, circonia, etc.) y son muy resistentes a la corrosión, no tóxicos y biocompatibles. La segunda generación

de materiales cerámicos, aparecida en los 80, pueden ser bioactivos e incluso reabsorbibles, como algunos fosfatos o sulfatos cálcicos y vidrios cerámicos, empleados como cementos o recubrimientos. Los últimos avances incluyen sustancias con actividad biológica en la estructura porosa de los cerámicos, como el Bioglass y los materiales mesoporosos [23]. Estos materiales favorecen la adhesión de proteínas y de células sobre su superficie.

A pesar de su buena biocompatibilidad, los cerámicos tienen la importante limitación de su alta fragilidad frente a impactos. Este inconveniente ha limitado su empleo a aquellas situaciones en que la carga aplicada sea predominantemente de compresión o bien a su utilización como recubrimientos [24].

Los materiales poliméricos tienen una amplia variedad de aplicaciones en el campo de la implantología médica ya que presentan propiedades físicas, químicas y mecánicas más cercanas a las de los tejidos vivos, ya que en su mayor parte están formados por polímeros naturales (como las proteínas y los polisacáridos). Además, son de fácil procesado y pueden obtenerse en diversas formas.

Actualmente existen numerosos polímeros utilizados en el campo biomédico. Algunos de ellos son estables y son utilizados para aplicaciones permanentes, como el polimetilmetacrilato (PMMA), empleado como cemento en las articulaciones, rellenando el espacio entre implante y hueso. El polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) es inerte y con alta resistencia a los impactos y a la abrasión, lo que le ha hecho candidato idóneo durante décadas para las articulaciones de prótesis, sobre todo de cadera y rodilla. Actualmente, el proceso conocido como osteolisis (pérdida patológica de hueso), ha hecho

que queden relegados a un segundo plano. Los poliacrilatos tienen excelente propiedades de transmisión de la luz, por lo que se emplean en lentes intraoculares y lentillas [25].

Entre los polímeros reabsorbibles, destacan el ácido poliláctico (PLA) o el poliglicólico (PGA), principalmente empleados en suturas quirúrgicas y materiales de osteosíntesis (clavos, placas, tornillos, etc). Adicionalmente a estos materiales, se encuentran los copolímeros de poli- ϵ -caprolactona [26], polianhídridos [27], los poliortoésteres [28] y otros [29, 30] que actualmente se encuentran bajo investigación.

Sin embargo, el bajo módulo de Young (ver apartado 1.3.1) y su naturaleza viscoelástica, han hecho que los polímeros hayan sido excluidos de aplicaciones donde la carga ejercida sea un parámetro relevante. Además, es difícil conseguir polímeros aptos para su empleo como implantes óseos que se hallen libres de aditivos que, bajo condiciones fisiológicas, puedan originar procesos alérgicos o toxicidad [24].

1.2.2 Materiales metálicos

Los materiales metálicos son los únicos capaces actualmente de soportar cargas elevadas y los que ofrecen propiedades mecánicas más próximas a las del tejido óseo. Su alto módulo y límite elástico, su ductilidad y su resistencia a la fractura les convierten en los materiales de elección cuando el implante debe soportar cargas cíclicas [24], es decir, en aquellas situaciones donde los requerimientos mecánicos prevalecen frente a los demás. Algunos materiales metálicos están siendo empleados como substitutos pasivos para reemplazar el tejido óseo, como las prótesis de cadera o rodilla e implantes dentales; como

ayuda en la consolidación de fracturas en forma de placas, tornillos y clavos, y también se han utilizado como “stents” vasculares, guías para catéteres, alambres en ortodoncia, implantes cocleares, etc. [31].

Sin embargo, los materiales metálicos pueden presentar también ciertos inconvenientes derivados de sus altas prestaciones mecánicas, como el fenómeno conocido como apantallamiento de tensiones o “stress-shielding”, que es causado por la diferencia de módulo elástico entre el material metálico y el tejido óseo [32-34]. Este efecto trae como consecuencia la pérdida de masa ósea y la atrofia del hueso u osteopenia [35, 36], lo cual debilita enormemente al hueso e incrementa el riesgo de fractura de éste e incluso del implante.

También los materiales metálicos bajo condiciones fisiológicas tienen tendencia a corroerse y como subproducto de esa reacción, liberar partículas metálicas e iones [37] hacia las zonas circundantes al implante, susceptibles de producir reacciones alérgicas, afectar al metabolismo celular [25], y en algunos casos acumularse en diversos órganos dando lugar a toxicidad sistémica [24].

Existen numerosos metales y aleaciones metálicas de uso en biomateriales. Alrededor de 1920 se desarrolló el acero 316L y se descubrió que tenía una buena biocompatibilidad y resistencia a la corrosión (en comparación con los metales utilizados anteriormente) debido a la formación de una fina capa en su superficie de óxido e hidróxido de cromo hidratados. Sin embargo, puede llegar a producirse su corrosión, siendo sus productos potencialmente peligrosos para el cuerpo humano [38].

En 1930 se desarrollaron las aleaciones de Co-Cr para aeronáutica y se demostró que tenían un mejor comportamiento en contacto con el cuerpo humano que el acero 316L. Las aleaciones de Co-Cr también tienen unas

buenas propiedades anticorrosivas por la formación de una capa de óxido de cromo en su superficie. Tiene mejor comportamiento frente a la corrosión que el acero y mejores propiedades mecánicas [38].

A mitad del siglo pasado el titanio puro y sus aleaciones se destacaron del resto de materiales metálicos por su ligereza [38] y por tener una excelente biocompatibilidad y resistencia a la corrosión, debido a la formación de una capa de óxido de titanio [20]. Entre las distintas aleaciones desarrolladas, el Ti6Al4V mejora notablemente las propiedades mecánicas del titanio comercialmente puro sin disminuir su biocompatibilidad. Sus propiedades mecánicas específicas, como la resistencia a fatiga (el doble de resistente que el Ti puro de grado 4 y casi cuatro veces más que el Ti puro de grado 1 [39]) y su bajo módulo elástico (que representa la mitad o menos del que poseen otros materiales como el acero inoxidable para uso quirúrgico o las aleaciones Co-Cr [40, 41], lo que provoca menor “stress-shielding” en el hueso), hace que esta aleación sea una de las más empleadas en prótesis dentales y en vástagos de prótesis articulares. No obstante, se ha demostrado que esta aleación puede liberar pequeñas cantidades de iones Al y V, susceptibles de provocar efectos negativos en el cuerpo humano.

Un material metálico muy interesante en aplicaciones de sustituciones temporales, es el magnesio. El magnesio fue postulado como elemento químico en 1755 por el inglés Joseph Black y aislado efectivamente por Sir Humphrey Davy en 1808 mientras que su ayudante, Michael Faraday, desarrolló en 1833 las bases para su producción mediante electrolisis a partir de $MgCl_2$. La producción comercial empleando este método fue iniciada en 1862, basándose el método ideado por Robert Bunsen diez años antes [42, 43].

En la actualidad se ha convertido en el tercer elemento metálico estructural más utilizado, solo superado por el aluminio y el acero [44]. En cuanto a su disponibilidad, el magnesio es el cuarto elemento más abundante de la tierra [45], siendo el octavo elemento en abundancia de la corteza terrestre (2,2%). Entre sus propiedades destaca su gran ligereza ($\rho = 1,7 \text{ g cm}^{-3}$, que supone dos terceras partes de la del Al o un cuarto de la del acero), que combinada con sus propiedades mecánicas convierten al magnesio en uno de los materiales metálicos con mayor resistencia específica. Otras características atractivas de este metal son su media / alta conductividad térmica y eléctrica, su no-toxicidad, su comportamiento no magnético o su capacidad de ser mecanizado por métodos convencionales. En la tabla 1.2.2 se resume las principales características de los biomateriales metálicos:

Material	Ventajas	Limitaciones	Principales usos
Acero inoxidable	Bajo coste Disponibilidad	Alto módulo	Prótesis de cadera (clavos, placas, tornillos)
Aleaciones de Co	Resistente al desgaste, la corrosión y a la fatiga	Alto módulo. Menor disponibilidad	Articulaciones (cadera, rodilla)
Ti y sus aleaciones	Biocompatibilidad Bajo módulo Resistencia a la fatiga y a la corrosión	Baja resistencia al desgaste	Implantes dentales y en articulaciones como vástago (cadera, rodilla; clavos, placas, tornillos)
Mg y sus aleaciones	Biodegradabilidad	Cinética de biocorrosión demasiado rápida	(clavos, placas, tornillos)

Tabla 1.2.2 Resumen de biomateriales metálicos empleados en la actualidad.

1.3 REQUISITOS QUE DEBE CUMPLIR UN BIOMATERIAL

1.3.1 Propiedades mecánicas

En la Tabla 1.3.1 se muestran las principales propiedades mecánicas del tejido óseo y de los tres grandes grupos de biomateriales inorgánicos:

	Resistencia a tracción (MPa)	Resistencia a compresión (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Tenacidad (MPa)
Hueso cortical	50-150	160-150	10-40	2-12
Hueso medular	10-20	20-25	0,2-0,5	
Acero inox.	480-1000	170-300	190-210	20-100
Ti y aleaciones	900-1200	450-1850	110-120	45-65
CoCr y aleaciones	400-1900	480-600	210-250	120-160
Mg y aleaciones	165-220	100-165	40-45	
Alúmina	280-600	4500	360	3-6
Circonia	800-1500	2000	220	6-11
Hidroxiapatita	120	350-400	80-110	1
Vidrio cerámico	220	1100	120	2
PMMA	20-50	20	0,6-2,2	
UHMWPE	35-80	80	2,2-4,8	0,7-1,6

Tabla 1.3.1 Resumen comparativo de propiedades mecánicas de los biomateriales más comunes (modificado de [47]).

El implante debe poseer unas propiedades mecánicas lo más parecidas a las del hueso donde va a ser insertado. Por ejemplo, si se excede el módulo de Young, se produce el fenómeno del apantallamiento (“stress shielding”), en el que la carga ejercida se redistribuye, soportando la mayor proporción del esfuerzo el implante y la menor el hueso que lo acoge. El resultado habitual de este desfase es la osteopenia del hueso circundante [46].

1.3.2 Biocompatibilidad

La Conferencia de Chester de la European Society for Biomaterials de 1986 [13], definió la biocompatibilidad como la capacidad de un material de ser utilizado en una aplicación específica con una respuesta adecuada del tejido receptor. Es una definición amplia, que no profundiza sobre aspectos tales como la forma en que se debe evaluar la biocompatibilidad.

Esta carencia se suplió con la norma ISO10993-1, donde se detallan una serie de ensayos *in vitro* que debe superar un biomaterial para ser considerado biocompatible. La norma intenta detectar posibles daños irreversibles producidos por el uso del material. Sin embargo, no evalúa la respuesta del material en la zona de implantación y para la función específica que ha de desempeñar.

En la práctica se evalúa si el material, después de aproximadamente un mes de implantación, queda envuelto en una cápsula de tejido fino, cartilaginoso y no vascularizado, con una reacción poco agresiva por parte del sistema inmune o si se produce una “reacción a cuerpo extraño”.

Tras la cirugía en la que se introduce un implante dentro de un tejido, se produce una secuencia de reacciones bien establecida: herida, hematoma, inflamación aguda, inflamación crónica y tejido granuloso [48]. Un último paso es el que marca la biocompatibilidad: si el implante es aceptado, se forma la

cápsula fibrótica (de mayor o menor espesor) que lo rodea y si es rechazado se desencadena la reacción a cuerpo extraño: los monocitos y los macrófagos forman células gigantes multinucleadas en un intento de fagocitar el implante mediante la secreción de agentes oxidantes.

Por lo general se llevan a cabo dos tipos de ensayo para determinar la biocompatibilidad:

In vitro: es el primero de los ensayos a los que se recurre. La inhibición de la proliferación celular o su muerte, son indicativos de que el material ensayado no es biocompatible.

In vivo: tras la implantación debe obtenerse una respuesta no más grave que una respuesta inflamatoria mínima, que tras 2 ó 3 semanas debe concluir en la formación de una cápsula fibrótica que rodea el implante, resultado típico frente a un trauma quirúrgico. Los macrófagos pueden estar presentes en el área durante años, pero con baja o escasa reactividad y sin indicativos de respuesta adversa ni local ni sistémica. Si hubiera presencia de células gigantes de cuerpo extraño en la interfase implante-tejido, podría estarse produciendo una reacción a cuerpo extraño, antecesora de un rechazo.[49]

Una vía indirecta de toxicidad provocada por los implantes es que pueden ser transmisores de microorganismos patógenos. Es importante una buena técnica esterilizadora para evitar o minimizar este problema.

Los metales, vidrios y cerámicos pueden liberar iones y otros compuestos que forman parte de su composición [49]. La toxicología estudia si esas partículas o iones son liberados y el tipo de reacción negativa que pueden provocar sobre cultivos celulares (*in vitro*) o sobre los tejidos adyacentes al implante o de forma sistémica a todo el organismo (*in vivo*).

La complejidad del medio *in vivo*, con múltiples tipos celulares, conlleva que en ocasiones se produzcan reacciones a cuerpo extraño frente a materiales que no han sido rechazados *in vitro*, con cultivos de un solo tipo celular [49].

Se entiende por toxicidad sistémica los efectos dañinos producidos en órganos y tejidos situados lejos del implante provocados por los constituyentes del implante que han sido liberados al organismo [49].

1.3.3 Biodegradación

La biodegradación es la capacidad del organismo para descomponer un implante. Lo ideal es que el implante sea también bioabsorbible, de forma que los productos de la biodegradación sean metabolizados y excretados sin dejar rastro.

La gran mayoría de los implantes metálicos permanecerán en el cuerpo del paciente toda su vida o hasta que sea retirado de forma quirúrgica. Sin embargo, hay ciertas situaciones en las que esta permanencia no es realmente requerida e incluso puede considerarse desfavorable. Como ejemplos pueden citarse el empleo de sujeciones temporales durante el sellado de fracturas y el uso de mallas intravasculares (“stents”) en edades tempranas. En estas situaciones, el empleo de materiales biodegradables y reabsorbibles es una buena alternativa.

1.4 BIOMATERIALES METÁLICOS EN LA REDUCCIÓN DE FRACTURAS

El número de fracturas relacionadas con osteoporosis se ha duplicado en la última década. Se estima que 40% del total de mujeres con más de 50 años de edad sufrirá alguna fractura osteoporótica y se calcula que el número de

fracturas de cadera aumentará de aproximadamente 1,7 millones sufridas en el año 1990 a 6,3 millones en el año 2050.

Además, se asume que el número de personas mayores de 50 años se duplicará entre los años 1990 y 2020. En Europa, en el año 2010, hubo por primera vez más personas mayores de 60 años que menores de 20. Por lo tanto, las patologías y traumatismos relacionados con fracturas óseas son un tema de gran impacto en la sociedad. Tanto la implantología ortopédica como la cardiovascular están generando una demanda creciente de personal médicamente formado, recursos, dispositivos y nuevos materiales [50].

El objetivo de las técnicas de restauración de fracturas es conseguir la regeneración y consolidación de las mismas, respetando la anatomía original lo más posible y recuperando al mismo tiempo el máximo de funcionalidad del hueso. En el caso de las fracturas de huesos sometidos a carga, se requieren biomateriales con prestaciones mecánicas capaces de soportar esfuerzos elevados durante el período de consolidación del hueso. En estos casos, los materiales metálicos son actualmente los más utilizados, pues son los únicos que permiten el mantenimiento de la continuidad y de la alineación de las partes fracturadas, y la transmisión de la carga durante la formación del callo óseo [51].

Existen diversos tipos de medios de osteosíntesis y pueden dividirse en dispositivos de fijación externa y dispositivos de fijación interna (Figura 1.4.1).

Los fijadores externos consisten en clavos o tornillos metálicos de una longitud tal que puedan atravesar el hueso fracturado y los tejidos muscular y cutáneo. Después de ser alineados uniendo los extremos fracturados, los clavos o tornillos son fijados por medio de una barra externa. Este sistema permite variar, según sea el caso, la rigidez de la fijación durante el período de

consolidación de la fractura. Como contrapartida, el empleo de fijadores externos implica el mantenimiento de un acceso a través del tejido cutáneo, con el consiguiente riesgo de infecciones.

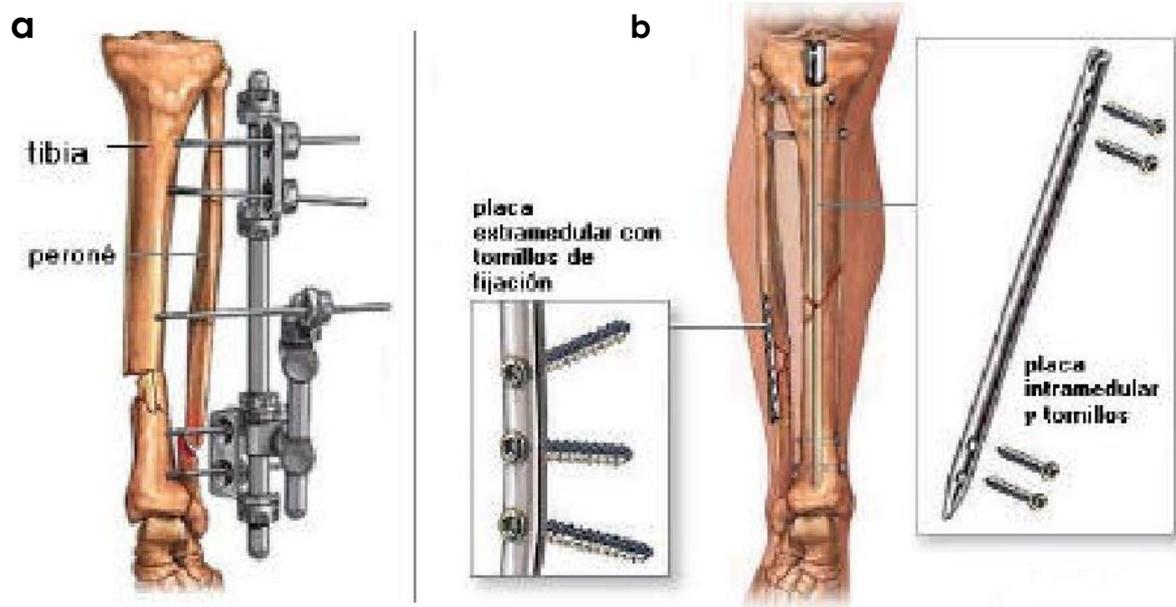


Figura 1.4.1 Sistemas de fijación ósea, (a) externo, (b) interno (adaptado de [24]).

Los fijadores internos, tal como su nombre indica, son implantados en contacto con el hueso del paciente. Los fijadores de este tipo más empleados son:

Placas de Osteosíntesis: fueron el primer método desarrollado para la fijación quirúrgica de fracturas y son actualmente el sistema más usado [52]. Se dice que Hansmann en 1886 fue el primero en estabilizar una fractura usando una placa. Desde entonces se han realizado diversas modificaciones en el diseño de este tipo de placas, con el fin de optimizar la función de las mismas dependiendo de la zona del hueso en la cual serán implantadas. Existen placas rectas para la diáfisis, placas especiales para la epífisis y metáfisis y placas en ángulo para el fémur proximal y distal, entre otras. Además, difieren según la

configuración mecánica del sistema placa / hueso y la función que desarrollan. La Figura 1.4.2 muestra algunos de los modelos de placas de osteosíntesis comúnmente utilizadas para fijación ósea.

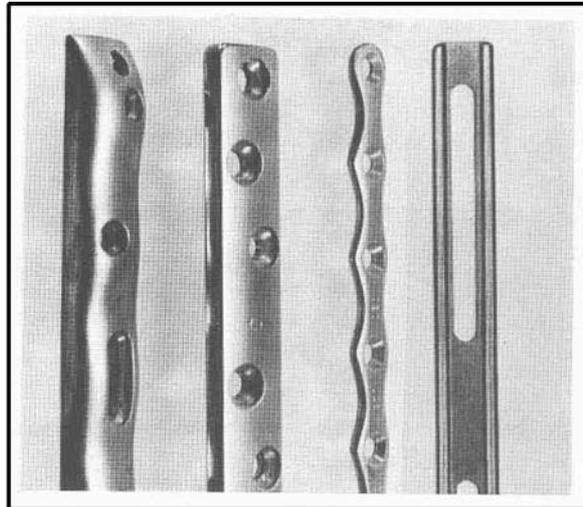


Figura 1.4.2 Placas de osteosíntesis comúnmente utilizadas en reparaciones óseas.

Clavos Intramedulares: Senn en 1893 [53] y luego Hey-Groves [54] en 1919, comunicaron los primeros casos relativos a la fijación intramedular para el tratamiento de fracturas. Sin embargo, fueron los hermanos Rush [55] en Europa los conocidos como los verdaderos pioneros de la fijación mediante clavos intramedulares.

Esta técnica consiste en la unión de los fragmentos óseos colocando un clavo en el canal medular de los huesos largos. Desde el punto de vista biomecánico, tal colocación le confiere al hueso una buena resistencia a la flexión, aunque no a la torsión. Con esta técnica, el paciente puede aplicar cargas más rápidamente que con otro tipo de implantes. La inserción de los clavos no requiere de la disrupción de una gran área del tejido blando local, con lo cual disminuye la posibilidad de infecciones e incrementa la incidencia de

consolidación del hueso. Sin embargo, en el caso de que surjan complicaciones, éstas son frecuentemente muy difíciles de manejar. Además, extraer un clavo que se haya roto, generalmente requiere abrir la zona del hueso donde se encuentra la rotura.

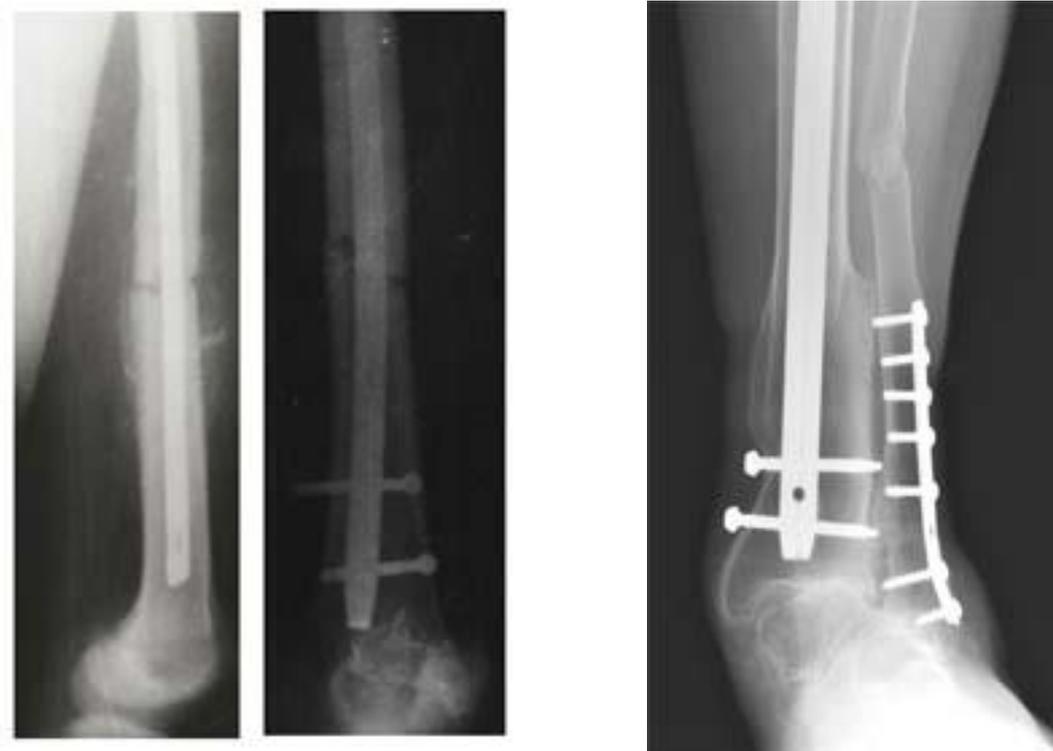


Figura 1.4.3 Fémures humanos fracturados e implantados con clavos (con y sin fijación por tornillos) [izq.] y un sistema mixto de clavo y placa en tibia y peroné [dcha.].

1.5 IMPLANTES METÁLICOS BIODEGRADABLES: EL MAGNESIO Y SUS ALEACIONES

Un salto conceptual llegó con la idea de aunar las propiedades mecánicas de los materiales metálicos junto con la capacidad de ser reabsorbibles. La primera cita de empleo del magnesio como biomaterial se refiere a Edward Huse, quien en 1878 lo utilizó como material de sutura en humanos para frenar

la hemorragia de vasos seccionados en operaciones quirúrgicas [56]. Tanto Huse como Erwin Payr en 1900, que lo empleó en diferentes áreas quirúrgicas [57], ya fueron conscientes del proceso de corrosión del magnesio *in vivo*. Payr determinó una velocidad de degradación del Mg puro de 0,1 g en 3 ó 4 meses en humanos [57] y constató que dicha velocidad dependía del grosor del implante y de la riqueza en vascularización del área. También pensó que el hidrógeno formado se acumularía formando cavidades rellenas de gas en el tejido que rodeaba el implante, pero descubrió que ese gas formado podía ser absorbido por el cuerpo.

En esa misma época, Lambotte utilizó una placa de magnesio y tornillos de acero para fijar una fractura mal alineada en una pierna. La masiva producción de hidrógeno debido a la reacción electroquímica entre los dos metales y el dolor producido en el paciente le obligaron a retirar el implante [58].

Andrews en 1917 también destacó que la degradación dependía más de la superficie que del peso del implante [59]. Seelig apuntó que dependía también del tejido que rodeaba el implante [60]. McBride en 1938, llegó a la conclusión de que el Mg puro no era un material adecuado para implantes endomedulares, ya que el volumen de gas formado no tenía una vía de salida hacia el exterior. Tras la autopsia, encontró sobre la superficie del implante una capa de carbonatos y fosfatos de Mg. Sin embargo, también observó que la corrosión era más lenta en implantes intramedulares que en los transcorticales [61]. Llegó a la conclusión de que si la degradación fuese relativamente lenta, como sucede con implantes intramedulares, el organismo sería capaz de absorber el gas a la misma tasa en la que éste se forma. Como en ese momento el problema de su control se veía insalvable, el magnesio fue desplazado por el acero V2A en su uso como

biomaterial [57].

Las aleaciones de Mg fueron introducidas en cirugía en la primera mitad del siglo XX con el fin de paliar el principal problema de los materiales con base Mg: una tasa de degradación demasiado rápida que conlleva por un lado que el implante pierda sus propiedades mecánicas antes de la recuperación estructural del hueso y por otro la generación de H₂ como subproducto de la reacción (aproximadamente 1 L de H₂ por cada g de Mg), que puede llegar a acumularse en los tejidos [24].

Para tratar de controlar esa tasa de corrosión, se ha probado a alear el Mg puro con cantidades pequeñas de otros metales: Al, Zn y Mn (serie AZ) o tierras raras (WE43, LAE 442), con resultados prometedores [24].

Las aleaciones de magnesio se identifican según la norma ASTM, donde la denominación de cada aleación consta de cuatro símbolos. En primer lugar, se indican los dos elementos principales de aleación mediante dos letras, seguido por una segunda parte constituida por dos números enteros relacionados con el porcentaje en peso de cada uno de ellos en la aleación. Así por ejemplo, la aleación con un 3 % de aluminio y un 1 % de zinc se denomina como AZ31.

En los estudios realizados durante esta tesis doctoral se ha utilizado magnesio puro y aleaciones de magnesio del sistema Mg-Al-Zn. Estas aleaciones presentan una combinación óptima de resistencia y ductilidad junto con una buena resistencia a la corrosión y bajo coste [42]. El aluminio se adiciona para aumentar la resistencia mecánica y la moldeabilidad. Por encima del límite de solubilidad del Al en Mg, se produce la precipitación de Mg₁₇Al₁₂ (fase β); compuesto intermetálico que puede disminuir la resistencia a la corrosión de la aleación, al formar micropares galvánicos que aceleran la

corrosión [62, 63]. En cambio, si la aleación se compone de fase α , sin precipitación de fase β , mejora la resistencia a la corrosión [64-66].

La presencia del Zn disminuye el tamaño de grano y aumenta la plasticidad y la resistencia a la tracción. La resistencia mecánica es mayor que en las aleaciones del sistema Mg-Al.

Sin Al y Zn, el Mg puro sufre una biodegradación mucho más rápida [67-70]. En la aleación AZ31, con un 3% de aluminio, hay una mínima presencia de fase β . En contraposición, la aleación AZ61, presenta una cantidad significativa de fase β , aunque ésta se encuentra dispersa en los límites de grano de la aleación sin formar una red continua, a diferencia de lo que ocurre en otras aleaciones con un contenido superior de aluminio, como la aleación AZ91.

El manganeso se introduce en la aleación como una impureza o contaminante durante el proceso de fabricación [71]. Se combina con Al formando compuestos del tipo AlMn, Al₆Mn o Al₄Mn.

Aleación	Al	Mn	Zn	Fe	Ni	Tierras raras
AJ52A	5,0	0,38	0,2	-	-	2,0
AJ62A	6,0	0,38	0,2	-	-	2,5
AM50A	4,9	0,32	0,2	4 10 ⁻³	2 10 ⁻³	-
AM60B	6,0	0,42	0,2	5 10 ⁻³	2 10 ⁻³	-
AS41B	4,2	0,52	0,1	3 10 ⁻³	2 10 ⁻³	-
AZ31B	3,0	0,60	1,0	5 10⁻³	5 10⁻³	-
AZ61A	6,5	0,33	0,9	5 10 ⁻³	5 10 ⁻³	-
AZ80A	8,5	0,31	0,5	5 10 ⁻³	5 10 ⁻³	-
AZ81A	7,6	0,24	0,7	-	-	-
AZ91D	9,0	0,33	0,7	5 10 ⁻³	2 10 ⁻³	-
AZ91E	9,0	0,26	0,7	5 10 ⁻³	1 10 ⁻³	-

Tabla 1.5.1 Aleaciones de Mg con Al empleadas comúnmente. Contenido de constituyentes en % (modificado de [72]).

Algunos metales son inertes y se degradan muy lentamente (Au, Pt), pero

los demás tienen distinta tendencia a degradarse dependiendo de su potencial de electrodo. Como puede verse en la Tabla 1.5.2, el Mg se caracteriza por un bajo potencial estándar de reducción ($-2,38$ V con respecto al electrodo del hidrogeno), presentando por tanto un comportamiento anódico respecto a la mayoría de los metales y aleaciones.

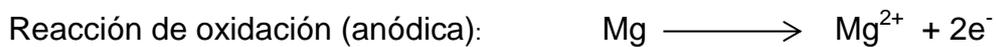
Semirreacción	E^0 (V)
$\text{Li}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Li}(\text{s})$	-3,05
$\text{Na}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Na}(\text{s})$	-2,71
$\text{Mg}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Mg}(\text{s})$	-2,38
$\text{Be}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Be}(\text{s})$	-1,85
$\text{Al}^{3+}(\text{aq}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Al}(\text{s})$	-1,68
$\text{Ti}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Ti}(\text{s})$	-1,63
$\text{Ti}^{3+}(\text{aq}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Ti}(\text{s})$	-1,21
$\text{Mn}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}(\text{s})$	-1,18
$\text{Zn}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Zn}(\text{s})$	-0,76
$\text{Cr}^{3+}(\text{aq}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Cr}(\text{s})$	-0,74
$\text{Fe}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{s})$	-0,44
$\text{Ni}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Ni}(\text{s})$	-0,25
$\text{Ag}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}(\text{s})$	0,80
$\text{Hg}^{2+}(\text{aq}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Hg}(\text{l})$	0,85
$\text{Au}^{3+}(\text{aq}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Au}(\text{s})$	1,52
$\text{Au}^+(\text{aq}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Au}(\text{s})$	1,83

Tabla 1.5.2 Serie electroquímica de los elementos metálicos más representativos.

Sin embargo, en soluciones acuosas su potencial de corrosión asciende a $-1,5$ V [73]. Esto se asocia a la formación en la superficie de capas parcialmente protectoras de una mezcla de MgCO_3 , MgO y $\text{Mg}(\text{OH})_2$ que eleva el potencial a valores menos negativos. La formación de esta capa protectora sólo es posible en medio alcalino, en ausencia de aniones agresivos como los cloruros, porque entonces lo que se genera mayoritariamente es una capa de MgCl_2 , mucho más

soluble, con lo que el efecto protector se pierde [57].

El medio fisiológico al que el biomaterial está expuesto es un medio acuoso que contiene aniones, cationes, oxígeno disuelto y una mezcla compleja de sustancias orgánicas [49]. La concentración de cloruros es aproximadamente 115 mM (una cuarta parte de la del agua de mar). Esto lo convierte en un medio bastante agresivo para los implantes metálicos [74], que corroe el magnesio y sus aleaciones, liberando H₂ proveniente del agua [75], según las siguientes semirreacciones:



La concentración de oxígeno no parece afectar a la corrosión de magnesio en medios acuosos [73].

Además del ataque generalizado en la superficie del implante, pueden producirse otros tipos de corrosión actuando de forma sinérgica:

Corrosión por picadura: Se trata de una corrosión localizada que ocurre a causa de ciertas imperfecciones en la capa de óxido superficial, donde la barrera protectora desaparece. En esos puntos la corrosión continúa hacia el interior, produciéndose el ataque localizado en forma de picaduras. El proceso se acelera porque estos puntos actúan entonces como ánodos mientras el resto de la superficie se convierte en un cátodo. En el magnesio, este tipo de ataque normalmente se inicia en forma de picaduras irregulares, las cuales crecen en número y terminan cubriendo toda la superficie, dando lugar a corrosión generalizada [76].

Corrosión galvánica: Este tipo de corrosión ocurre cuando el magnesio está en contacto con otros metales con mayor potencial de electrodo que él o existen segundas fases o impurezas en la aleación que actúan como cátodos, aumentando la velocidad de corrosión.

Tratamientos de superficie

Como la corrosión es un fenómeno que afecta inicialmente a la superficie del material, es posible mejorar su resistencia mediante tratamientos superficiales [77]. Esta estrategia ofrece la posibilidad de mejorar la resistencia a la corrosión a materiales que tienen excelentes cualidades mecánicas [49].

Se ha ensayado un abanico de estrategias para intentar proteger las aleaciones de magnesio de la corrosión:

1. Métodos químicos: limpieza con disolvente, ataque ácido, ataque alcalino, pasivado, anodizado, electropulido.
2. Métodos al vacío: descarga lumínica, descarga eléctrica, implantación iónica.
3. Métodos de recubrimiento: proyección por plasma, sol-gel, “magnetron sputtering”, ablación láser.
4. Métodos bioquímicos: enlace de iones y/o moléculas activas por adsorción fisicoquímica, por enlace covalente con o sin espaciador, y por inclusión en materiales que actúan de portadores.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Selección de un material de base magnesio susceptible de ser empleado como material reabsorbible de osteosíntesis para la consolidación de fracturas óseas.

Para su consecución, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- A) Caracterización *in vitro* de materiales de base magnesio: Mg procesado por colada y por vía pulvimetalúrgica, y la aleación AZ31, en estado de recepción o modificados superficialmente. Estudio de sus propiedades mecánicas y resistencia frente a la corrosión en medio de cultivo celular.
- B) Selección del material más adecuado y estudio de su biocompatibilidad en cultivos celulares y en ensayos *in vivo*.
- C) Evaluación del efecto local producido por la biodegradación *in vivo* del material seleccionado, durante largos tiempos de experimentación, tanto en presencia de fractura femoral como en ausencia de ella.
- D) Cuantificación de la acumulación de trazas metálicas a nivel sistémico, en órganos distantes del implante, liberadas como consecuencia del proceso de biodegradación de los implantes, para largos tiempos de evolución en fémures de ratas con y sin fractura.

3. *MATERIALES Y MÉTODOS*

3.1 MATERIALES

3.1.1 Composición

Los materiales de base magnesio objeto de estudio fueron los siguientes:

- Magnesio puro (99,8% de pureza) obtenido por vía pulvimetalúrgica (Mg PM) y extruido a 420 °C.
- Magnesio puro (99,8% de pureza) obtenido por colada (Mg colado).
- Aleación de magnesio AZ31, en forma de chapa de 3 mm de espesor, procesada por laminación, suministrada por Magnesium Elektron Ltd. (Manchester, England). Esta aleación se recibió en la condición "O-temper", consistente en un tratamiento de recocido a 345 °C, que provoca una solubilización que hace desaparecer la fase $Mg_{17}(AlZn)_{12}$.

La tabla 3.1.1 muestra la composición química de los materiales de base magnesio analizados mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos-X (WDXRF).

Material	Al	Si	Mn	Fe	Ca	Cu	Zn	Mg
Mg PM	0,030	0,031	0,019	0,015	0,110		-	balance
Mg colado	0,025	0,014	0,071	0,006	-	0,010	0,051	balance
AZ31	3,370	-	0,220	-	-	-	0,778	balance

Tabla 3.1.1. Composición, expresada en % en masa, de los materiales de base magnesio obtenida mediante WDXRF.

Se eligió trabajar con sustratos de magnesio con diferentes rutas de procesado, en este caso, magnesio obtenido por vía pulvimetalúrgica y por

colada. Por otro lado, la aleación representa una de las formas para hacer a un material más resistente a la corrosión, adicionando elementos aleantes que favorezcan la protección frente a la corrosión.

En este trabajo, las superficies de los distintos materiales de base magnesio se prepararon siguiendo el mismo procedimiento: se lijaron consecutivamente utilizando papel abrasivo de carburo de silicio (SiC), grados 600 y 1200. Entre los lijados con los distintos papeles abrasivos, se lavaron con agua desionizada, a continuación con etanol y se secaron con aire caliente.

3.1.2 Microestructura

Para realizar la caracterización de los sustratos, las superficies se pulieron sucesivamente con pasta de diamante de 3 μm y de 1 μm , realizando un pulido final con sílice coloidal. Entre los pulidos, las muestras se lavaron con agua desionizada y alcohol y se secaron con aire caliente.

Para revelar las características de la microestructura de las muestras, en el caso del Mg puro (colado y pulvimetalúrgico), fueron atacadas por inmersión durante dos minutos en 100 mL de una solución compuesta por HNO_3 (1% v/v) y etilenglicol (75 % v/v) en agua desionizada. En cambio, la aleación AZ31 fue atacada utilizando una solución de ácido pícrico (5 g), ácido acético (5 mL) y agua desionizada (10 mL) en etanol (100 mL) [71].

Siguiendo la norma ASTM E 562-99, se obtuvo mediante conteo puntual la fracción en volumen de la porosidad.

La caracterización microestructural de las distintas muestras se llevó a cabo mediante microscopía óptica, empleando un microscopio modelo BH2 (Olympus Optical Europe, Hamburg, Germany), y con mayor detalle mediante

microscopia electrónica de barrido (MEB) con un equipo modelo JSM 6500F (JEOL, Croissy-sur-Seine, Francia). Se trata de un microscopio electrónico de emisión de campo de bajo voltaje que opera entre 1 y 30 kV. Posee una resolución espacial de 3 nm y en el equipo se incluye análisis mediante rayos X por dispersión de energías (EDX), y por difracción de electrones retrodispersados (EBSD), y se empleó para determinar la composición de las fases presentes.

Las diferentes fases de la superficie fueron identificadas mediante difracción de rayos X (DRX), empleando un difractómetro Siemens D5000 (Bruker, Rivas-Vaciamadrid, España) con emisión de $\text{CuK } \alpha$, 40 kV y 30 mA, en el rango 2θ , entre 1° y 70° , con un paso de $0,05^\circ$.

3.1.3 Comportamiento mecánico

La caracterización mecánica de los sustratos de magnesio se llevó a cabo a través de la determinación del límite elástico y de la ductilidad. Para ello, se obtuvieron muestras de tracción de 10 mm de longitud y sección transversal de $2 \times 4 \text{ mm}^2$ de los materiales en estudio. Estas muestras se ensayaron a una velocidad constante de deformación ($\dot{\epsilon}$) de 10^{-3} s^{-1} y a una temperatura de 300° K [78], usando una máquina de ensayo Instron (Barcelona, España).

3.1.4 Modificación superficial

La degradación del Mg y sus aleaciones presenta cinéticas o velocidades de corrosión muy elevadas. En este estudio se ha depositado un recubrimiento de MgF_2 sobre la superficie de los sustratos de base magnesio para tratar de frenar el proceso de degradación de dichos materiales. El recubrimiento se

obtuvo mediante un tratamiento de conversión química realizado por inmersión en HF al 48% a temperatura ambiente durante 24 horas [81], seguida de un lavado con agua desionizada y posterior secado mediante una corriente de aire caliente [82]. El estudio de la topografía y la medida del espesor de los recubrimientos obtenidos sobre cada substrato de Mg se llevó a cabo respectivamente mediante observación de la superficie y de cortes transversales de los mismos en el microscopio electrónico de barrido.

3.1.5 Ensayos de corrosión

Para llevar a cabo los ensayos *in vitro* de comportamiento frente a la corrosión de las muestras de magnesio (Mg PM, Mg colado y AZ31), en estado de recepción y con el recubrimiento aplicado de MgF_2 , se utilizaron probetas planas de 10 mm de diámetro cuya superficie se preparó según el procedimiento anteriormente descrito.

El comportamiento frente a la corrosión se evaluó mediante sonda Kelvin de barrido (SKP), seguimiento del potencial de corrosión y medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS). Asimismo, se calculó la intensidad de corrosión utilizando la ecuación de Stern and Geary: $I = BR^{-1}$, donde B es la constante de Tafel, que toma un valor de 26 mV, en los materiales activos, y un valor de 52 mV, en materiales pasivos; y R es la resistencia frente a la corrosión calculada a partir del valor del diámetro del semicírculo en los diagramas de impedancia de Nyquist.

3.1.5.1 Sonda Kelvin de barrido (SKP)

La sonda Kelvin de barrido se ha utilizado para evaluar la reactividad superficial a través de mapas de potencial de la superficie de los materiales de magnesio, tanto en estado de recepción como recubiertos.

En esta técnica, una punta de Ni-Cr de 50 μm de diámetro barre la superficie de las muestras y registra valores de la función de trabajo que son extrapolados a valores del potencial de corrosión. Para ello, la punta de la sonda Kelvin se calibra con una solución saturada de CuSO_4 en contacto con un pocillo de Cu. Las medidas se realizaron barriendo áreas de $3 \times 3 \text{ mm}^2$, manteniendo la temperatura a 25°C y una humedad relativa superior al 95%. Los valores de potencial están referidos al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) [79].

3.1.5.2 Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

Los ensayos de corrosión se llevaron a cabo en una celda electroquímica convencional de tres electrodos: un alambre de Pt como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, siendo el electrodo de trabajo el material de base magnesio a estudiar. La evaluación del comportamiento frente a la corrosión se llevó a cabo en el mismo medio de cultivo que posteriormente fue utilizado en los ensayos *in vitro* con cultivos celulares: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con suero bovino fetal (FCS) (10% v/v) y con antibióticos (penicilina 100 U mL^{-1} y estreptomina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). La composición de este medio es compleja:

- sales inorgánicas: $0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ KCl}$, $0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4$
+ $7 \text{ H}_2\text{O}$, $6,40 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$, $3,70 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 y $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$.

- vitaminas: 0,03 g L⁻¹.
- aminoácidos: 1,15 g L⁻¹.
- otros componentes: 4,50 g L⁻¹ glucosa
- proteínas.

El medio se renovó a las 24 horas de comenzar el ensayo y posteriormente cada 48 horas hasta la finalización del experimento, siguiendo así el mismo protocolo experimental que en los ensayos *in vitro* con cultivos celulares.

Las medidas del potencial de corrosión se llevaron a cabo utilizando un potencióstato PAR 273A. Para los ensayos de impedancia electroquímica se utilizó un analizador de respuesta en frecuencia Solartron, modelo 1280 (Solartron Analytical, Hampshire, UK). A continuación se llevaron a cabo las medidas de impedancia en el potencial de corrosión, aplicando una onda sinusoidal de 10 mV de amplitud en un rango de frecuencias de 20 kHz a 1 mHz, espaciados logarítmicamente (cinco por década).

Todos los ensayos de impedancia electroquímica se llevaron a cabo a 37° C y a diferentes tiempos de inmersión, desde 1 h a 11 días. Los ensayos se realizaron por triplicado [83].

3.2 ENSAYOS EN CULTIVOS CELULARES

3.2.1 Cultivo celular

Los ensayos *in vitro* con cultivos celulares se llevaron a cabo exclusivamente con la aleación AZ31. Se emplearon 12 probetas de AZ31 de 10 mm de diámetro y 3 mm de grosor con capa exterior de MgF₂, que fueron

esterilizadas con radiación UV durante 5 minutos en una campana de flujo laminar antes de introducirlas en placas de cultivo de 24 pocillos. Sobre las probetas de AZ31 se sembraron dos líneas celulares murinas: 6 pocillos con MC3T3-E1 (pre-osteoblastos) y otros 6 con L929 (fibroblastos), más los correspondientes controles sin probeta. Estos tipos celulares, provenientes del banco de células animales del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), fueron elegidos por estar presentes en el medio donde se inserta un implante. Las células fueron sembradas a una densidad de 2×10^4 células cm^{-2} en medio DMEM. El cultivo se mantuvo durante 7 días en incubador a 37°C y 5% de CO_2 . El medio se renovó cada 48 horas.

3.2.2 Crecimiento celular

El crecimiento de las células se evaluó una vez fijadas las mismas sobre la superficie del material de ensayo. Para ello se añadió a 3 pocillos de cada tipo celular 1 mL de metanol a -20°C y se incubaron durante 10 minutos, seguido de un lavado con PBS y posterior incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con 1 mL de una solución de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ Hoechst 33258 en PBS [84]. El reactivo Hoechst es un colorante que se une al ADN del núcleo celular y emite fluorescencia cuando es iluminado con luz ultravioleta, permitiendo visualizar la presencia de células. De esta forma, las muestras se pudieron observar en un microscopio multidimensional Leica AF6000 LX (Mannheim, Germany) utilizando luz blanca y luz ultravioleta y se cuantificó el número de células presentes.

3.2.3 Viabilidad celular

Pre-osteoblastos y fibroblastos son líneas adherentes, de modo que las células de los restantes 6 pocillos (3 de cada tipo celular), fueron recuperadas mediante incubación con tripsina al 0,05%, para ser inmediatamente centrifugadas 5 minutos a 1000 g y resuspendidas en PBS. Alícuotas de 3×10^5 células fueron mantenidas en hielo hasta que se les añadió 1,5 ng de yoduro de propidio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) que actúa como un intercalante inespecífico para el ADN. Las muestras fueron analizadas de inmediato en un citómetro de flujo modelo Epics XL (Beckman Coulter Corp., Miami, FL, USA), provisto de un láser de argón, encargado de generar el haz de excitación (longitud de onda de 448 nm). La señal de fluorescencia emitida en respuesta por el yoduro de propidio fue obtenida tras pasar por un filtro de 620 nm. Aquellas células que mostraban fluorescencia en el interior, señal de que su membrana había sido permeable al yoduro de propidio, fueron consideradas como no viables.

3.3 ENSAYOS *IN VIVO*

3.3.1 Diseño experimental

Al igual que en la experimentación *in vitro* con cultivos celulares, los ensayos *in vivo* se realizaron únicamente con la aleación AZ31, que fue mecanizada hasta conseguir cilindros de 20 mm de longitud y 1 mm de diámetro ($15,71 \text{ mm}^3$ de volumen), con un peso medio de $28,0 \pm 0,3$ mg. Los cilindros fueron redondeados en ambos extremos para eliminar aristas vivas, tanto para facilitar la inserción dentro de la cavidad endomedular del fémur como para evitar los efectos de borde sobre la corrosión. La superficie fue lijada siguiendo

el mismo procedimiento anteriormente descrito. Por último, los implantes se sonicaron en etanol dentro de un baño de ultrasonidos [71] y fueron esterilizados con radiación, previamente a su inserción en los animales.

Los animales de experimentación para los ensayos *in vivo* fueron 45 ratas Wistar hembras, de 3 meses de edad y unos 200 g de peso, que fueron tratados de acuerdo con la Directiva del Consejo de Europa (2010/63/UE) y con el Real Decreto sobre protección de los animales utilizados para experimentación (RD 53/2013). La cirugía, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizó en el laboratorio del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz. El diagrama de trabajo puede verse en la Figura 3.3.1:

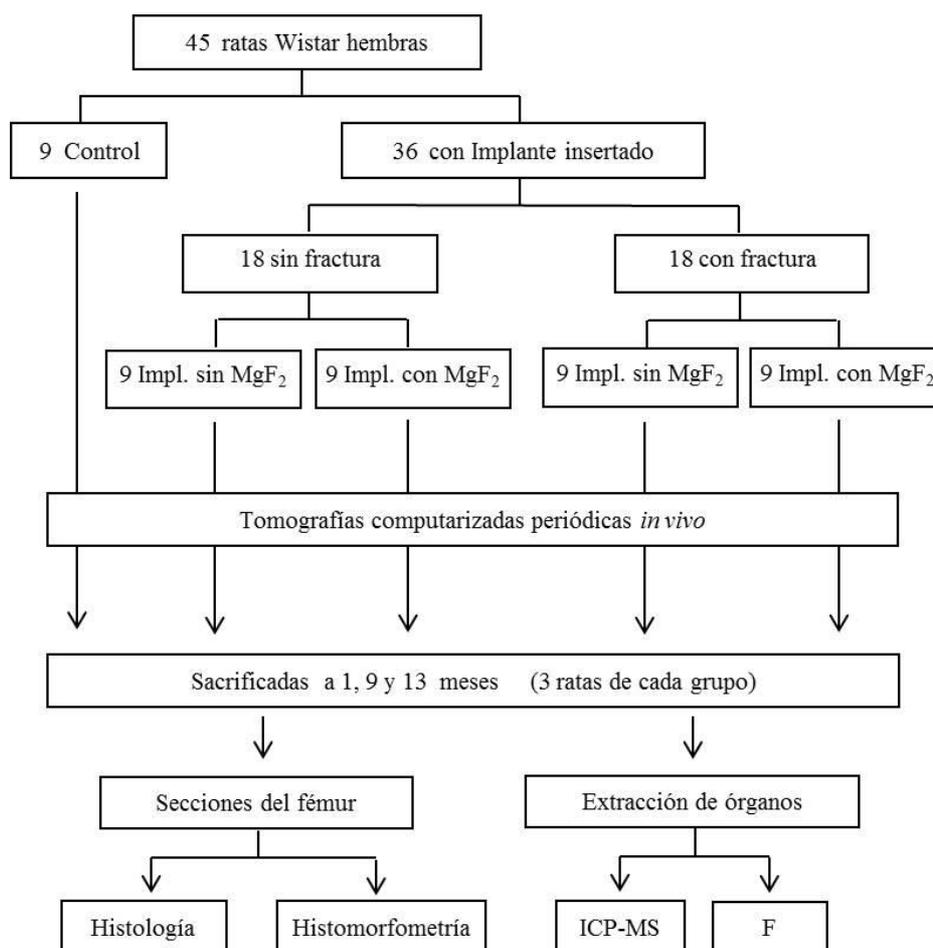


Figura 3.3.1 Esquema del diseño experimental llevado a cabo.

Las ratas fueron divididas de forma aleatoria en dos grupos principales: 9 ratas control sin implante ni cirugía y otras 36 ratas que recibieron un implante de AZ31. De este segundo grupo, 18 animales (la mitad) fueron sometidos a la fractura del fémur de su pata trasera izquierda, seguida de la inserción del implante (con el que se redujo la fractura recién provocada), mientras que las restantes 18 (la otra mitad) no sufrieron fractura, pero si recibieron un implante mediante el taladrado de un orificio de 1,1 mm de diámetro en el espacio intercondilar del fémur izquierdo.

A su vez, la mitad (9) de los implantes insertados en el grupo de ratas con fractura habían recibido un tratamiento superficial con HF y la otra mitad (9) permaneció sin él. La misma distribución (9 + 9) se realizó entre los implantes de las ratas sin fractura.

La fractura del fémur se llevó a cabo con animales anestesiados, mediante el corte de una de las corticales con una sierra de Gillies, seguida de la ruptura manual de la otra cortical.

Tras la cirugía, cada rata recibió una dosis profiláctica de analgésico y antibiótico: Enrofloxacin (BAYTRIL®, 10 mg Kg⁻¹) y Meloxicam (METACAM®, 2 mg Kg⁻¹), juntas en una sola inyección subcutánea. Todos los animales fueron estabulados en condiciones estándar, con libre disponibilidad de agua y alimento.

3.3.2 Tomografía computarizada

La evolución tanto de los implantes de AZ31 como de los fémures (tanto con fractura o sin ella) donde fueron insertados, fue seguida con el tiempo mediante tomografía computarizada. Esta técnica se basa en la diferente

capacidad de atenuación que presenta la materia al paso de los rayos X. A diferencia de la radiografía convencional que muestra un objeto tridimensional en una imagen bidimensional, la CT soluciona este problema escaneando múltiples secciones del cuerpo con un haz estrecho de rayos X (gracias a la presencia de un colimador) producidos por una fuente emisora que rota alrededor del mismo (Figura 3.3.2). La radiación que no es totalmente absorbida por el cuerpo es captada por un detector que se encuentra enfrente al tubo de rayos X y que gira simultáneamente con el mismo, obteniéndose una proyección. La intensidad con que la radiación se atenúa depende de la densidad del material que tienen que atravesar los rayos X, de manera que materiales más densos presentan una mayor capacidad de absorción a la radiación.

A continuación se produce el giro del conjunto fuente/detector en un pequeño ángulo, obteniéndose una nueva proyección. Finalmente, cuando se han completado 360°, se habrán obtenido todas las proyecciones posibles de esa sección.

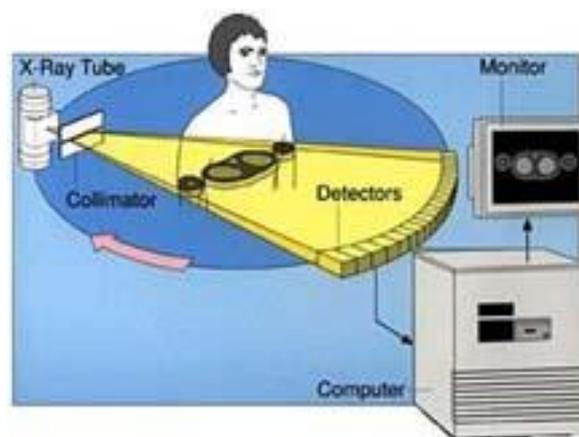


Figura 3.3.2 Componentes de la técnica de la tomografía computarizada.

Todos estos datos brutos son almacenados en un ordenador, que mediante la aplicación de algoritmos matemáticos (proceso de reconstrucción de la imagen tomográfica) origina la imagen tridimensional.

Con el fin de asegurar la inmovilización de los animales durante todo el proceso de adquisición tomográfica, éstos fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano/oxígeno (5% de isoflurano durante el período de inducción; 2% en mantenimiento). A continuación los animales fueron colocados en posición decúbito prono en la camilla del equipo.

El módulo CT del equipo mixto PET/CT Albira ARS (Oncovisión, España) presenta las siguientes características técnicas:

- Fuente de rayos X de 35 μm , 50 kV máximo, 1mA de corriente máxima.
- Area de vision (field of view -FOV-) de 64x64 mm².
- Resolución mínima de 90 μm .
- Detector de 2400x2400 pixeles.

Para la realización de estos estudios se configuraron los siguientes parámetros:

- Calidad de la adquisición: 600 proyecciones en cada adquisición.
- Intensidad de radiación: 0,8 mA
- Voltaje de la fuente de rayos X: 45 kV.

Antes de iniciar la adquisición de las imágenes de tomografía definitivas, se procedió a la obtención de una imagen preliminar planar (en 2 dimensiones)

tomada a 0°, con el fin de asegurar la correcta colocación del fémur en el escáner.

Una vez adquiridas, las imágenes fueron reconstruidas mediante un algoritmo de retroproyección filtrada. Tras su reconstrucción, se obtuvieron imágenes tridimensionales con un tamaño de matriz de 512 x 512 x 512 píxeles, presentando un tamaño de píxel de 0,125 x 0,125 x 0,125 mm. Estas imágenes fueron inicialmente visualizadas en el software Pmod (Pmod Technologies, Suiza), y almacenadas en formato ANALYZE para su posterior análisis.

Esta imagen tridimensional fue segmentada a voluntad en áreas ocupadas por implante u ocupadas por gas, mediante el programa informático ITK-SAP [85] y sus respectivos volúmenes fueron calculados a través de la información sobre resolución contenida en el archivo de cabecera en formato DICOM, que es el estándar reconocido mundialmente para el intercambio de pruebas médicas.

Estos ensayos fueron llevados a cabo en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de RMN y RSE de la Universidad Complutense de Madrid y en colaboración con el departamento de Tecnología electrónica de la Universidad Juan Carlos I de Madrid.

3.3.3 Análisis histológico e histomorfométrico

Todos los animales fueron sacrificados tras 1, 9 ó 13 meses desde la cirugía, mediante inyección intraperitoneal de 0,4 mg de pentobarbital sódico (Dolethal®) diluido en suero fisiológico.

Los fémures de las patas traseras izquierdas fueron extraídos, limpiados de tejido muscular y fijados en formaldehído al 10% (tamponado a pH 7), para ser deshidratados por inmersión en baños secuencialmente más concentrados de hidroximetil metacrilato, siguiendo el método de Donath y Breuner [86]. A continuación se cortaron en bloques y se incluyeron en resina Technovit[®], a partir de la cual se obtuvieron secciones transversales de 50 µm de grosor con una sierra de banda de diamante Exact 312 y se pulieron con un equipo Exact 400 CS (Exact, Norderstedt, Germany).

Las secciones de 50 µm obtenidas se tiñeron con las tinciones histológicas habituales: azul de toluidina y tricrómico de Masson. Se utilizó una variante de la tinción con azul de toluidina que no requiere la retirada previa de la resina y se basa en la inmersión de la muestra en hematoxilina de Weigert, lavado del excedente con agua destilada y posterior tinción con azul de toluidina a pH 4. El uso previo de la hematoxilina incrementa el efecto de la toluidina, con lo que los núcleos celulares aparecen en azul muy oscuro, casi negro. La sustancia intercelular queda claramente diferenciada en varios tonos de azul, dependiendo del grado de madurez del hueso.

El tricrómico de Masson hace posible la observación del tejido osteoide (no calcificado), que aparece teñido en color naranja, distinto del hueso maduro (calcificado), que se aprecia en verde. Los núcleos celulares se tiñen de rojo oscuro.

Una vez teñidos, los grupos de 5 cortes transversales, correspondientes a cada uno de los tiempos y condiciones del estudio, se fotografiaron mediante una cámara digital acoplada a un microscopio óptico. Las imágenes obtenidas se

analizaron mediante el programa informático MIP 4, con el que se calculó la diferencia entre el área original ocupada por el implante y el área que ocupa tras cada tiempo de implantación. Esta diferencia es la pérdida debida a su biodegradación.

El estudio de la histología e histomorfometría se llevó a cabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares.

3.3.4 Extracción y tratamiento de los órganos

Después de 1, 9 y 13 meses respectivamente desde su inserción, se extrajeron 205 órganos, correspondientes a los riñones, pulmones, hígado, bazo y cerebro de los 45 animales del estudio, empleando únicamente tijeras cerámicas (de óxido de circonio) y pinzas plásticas, para evitar la contaminación metálica de los órganos, que fueron entonces conservados a -20°C antes de ser trasladados al laboratorio, donde se disminuyó su temperatura hasta -80°C en un arcón congelador, paso previo para proceder a su liofilización, durante 72 horas, en un Benchtop 6K freeze dryer (VirTis, SP Scientific, New York, USA).

Una vez que las muestras habían perdido casi todo su contenido en agua, fueron reducidas a polvo y homogeneizadas empleando un molino de bolas de metacrilato (Ika Ultra-Turrax, Staufen, Germany).

Se tomaron alícuotas de cada muestra, se pesaron y se sometieron a una digestión ácida en un volumen de 50 mL (40 mL de agua desionizada, 8 mL de HNO_3 y 2 mL de H_2O_2) que se introdujo en vasos cerrados de alta presión del

tipo HPV 80 a los que se procedió a calentar aumentando la temperatura lentamente hasta alcanzar los 200°C, empleando un microondas Ethos Sel 1600 URM (Milestone, Connecticut, USA). La digestión se efectuó durante 10 minutos a 200°C. Todos los resultados posteriores fueron normalizados respecto del peso de muestra empleada en la digestión.

3.3.5 Análisis de trazas metálicas mediante ICP-MS

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es una técnica que se basa en la vaporización, disociación e ionización de los diferentes elementos químicos que se encuentran en el interior de un plasma, que en nuestro caso es de Ar. Los iones positivos generados durante este proceso son separados en función de su relación masa/carga y finalmente son detectados con un sistema multiplicador de iones. Esta técnica combina las excepcionales características del ICP para la atomización e ionización de la muestra inyectada con la sensibilidad y selectividad que ofrece la MS, por lo que ha sido una herramienta ampliamente empleada en la determinación de elementos metálicos presentes a niveles de trazas y ultratrazas en muy diversos materiales [87-91]. Para identificar y cuantificar cada una de las trazas metálicas acumuladas en los órganos extraídos de las ratas, las muestras digeridas fueron analizadas en un ICP-MS ELAN 6000 PE Sciex (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA).

Se analizaron los siguientes elementos metálicos: Mg, Al, Zn y Mn. El último de ellos fue incluido porque aparece como resultado de la contaminación típica de estas aleaciones resultante del proceso de fabricación [71].

Como control se utilizaron tejidos obtenidos de ratas no sometidas a la inserción de implante, pero mantenidas los mismos periodos e iguales condiciones de estabulación que las ratas que sí los portaban.

El límite de detección, calculado en base a la desviación estándar de diez medidas sucesivas de la solución control, fue de 0,2 ppm (empleando el criterio de 3σ). La precisión de la técnica en la cuantificación de Mg, Al, Zn y Mn se aseguró con la medida de un patrón certificado NIST de hígado bovino (SRM 1577b).

3.3.6 Análisis de flúor mediante electrodo selectivo

El análisis del flúor (F) no es posible mediante ICP-MS, porque su potencial de ionización es más alto que el del argón. Por esta razón, su estudio fue realizado mediante un electrodo selectivo para iones fluoruro, modelo Orión 9409BN, acoplado a un multímetro modelo Orion 720A⁺ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Los análisis fueron realizados sobre alícuotas de las mismas digestiones ácidas sobre las que se cuantificaron los niveles de Mg, Al, Zn y Mn por ICP-MS. De acuerdo al procedimiento empleado por Inkielewicz y Krechniak [92], se añadió un mismo volumen de Total Ionic Strength Adjustment Buffer (TISAB IV) a cada muestra para evitar la formación de complejos de fluoruro con iones Fe y Mg. El TISAB mantiene el pH por

debajo de 8 y protege de interferencias de estos dos iones cuando se hallan a concentraciones no superiores a 100 ppm. Puesto que análisis previos por ICP-MS arrojaron niveles del orden de 360 ppm para el Fe y 550 ppm para el Mg en hígado, las muestras fueron diluidas diez veces en agua milli-Q antes de la adición del TISAB. Se realizó una curva de calibración del instrumento empleando NaF como patrón, sometiéndolo a la misma digestión ácida sufrida por la muestras y con la misma adición posterior de TISAB.

3.4 ESTADÍSTICA

Los datos obtenidos fueron clasificados en diversos grupos según presencia o ausencia de fractura y de tratamiento con HF. Igualmente se clasificaron en función del tiempo de permanencia del implante y del órgano de procedencia. Se calcularon para cada uno de estos grupos la media y la desviación estándar (SD). Los test T de Student o el de Mann-Whitney fueron empleados para comparar la relación entre grupos independientes. La existencia de diferencias significativas entre pares de comparaciones fue establecida mediante ANOVAs, con corrección de Bonferroni, estableciéndose el nivel de significancia en el 95% de los casos ($p \leq 0,05$). Para estos cálculos se empleó el programa estadístico SPSS v.19.

También se empleó el coeficiente de correlación de Pearson para estudiar el grado de relación lineal entre variables, conocido habitualmente como análisis de correlación, utilizando para su cálculo el mismo programa estadístico.

4 RESULTADOS

El presente capítulo estudia la microestructura, el comportamiento mecánico y el comportamiento a corrosión en medio de cultivo celular (DMEM), tanto del magnesio puro (PM y colado), como de la aleación AZ31. Asimismo, con objeto de mejorar el comportamiento a la corrosión de estos materiales, este trabajo propone su protección superficial mediante un tratamiento en HF. Se evalúa comparativamente el comportamiento de los materiales en estado de recepción y modificados superficialmente.

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES DE BASE MAGNESIO

4.1.1 Microestructuras

La Figura 4.1.1 presenta las imágenes obtenidas por microscopía óptica de los sustratos de magnesio desnudos:

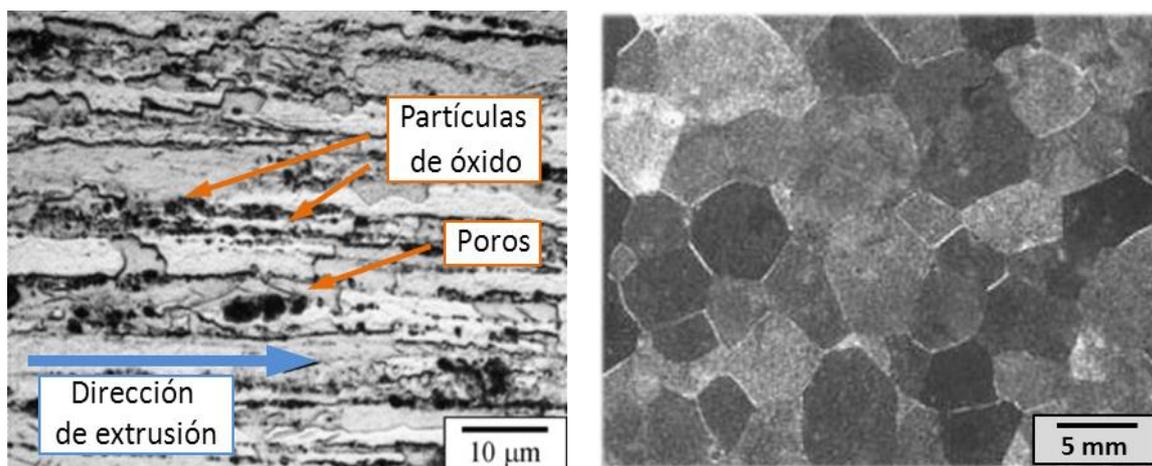


Figura 4.1.1 Microestructura de las muestras de Mg puro: pulvimetalúrgico (izq.) y colado (dcha.)

La microestructura del magnesio PM muestra un refinamiento de grano obtenido por el procesado vía pulvimetalúrgica debido a una recristalización

dinámica durante la extrusión en caliente. El tamaño de grano es heterogéneo alrededor de 5 μm o menor, con pequeñas partículas de óxido adheridas a los bordes de grano. Estas partículas proceden de la fractura durante la extrusión de la película que cubre el polvo original de magnesio [71]. En la micrografía de la Figura 4.1.1 izq., se pueden observar poros, característicos de este tipo de muestras, los cuales son cavidades del proceso de compactado y de extrusión de los polvos. La fracción en volumen de porosidad es de 0,098, es decir un 9.8%, valor que representa un porcentaje de porosidad bajo [93]. La porosidad existente en el magnesio PM indica que existe una aportación de mayor área superficial (que es la suma del área de la matriz y del área de las cavidades de los poros), que será atacada por el medio corrosivo. La microestructura del magnesio colado muestra granos equiaxiales, otros alargados y unos más pequeños que otros (el rango del tamaño de los granos está en el orden de los μm). Esa disposición diversa y el acomodo de granos es típica de una microestructura de una muestra colada, que no presenta porosidad, ni impurezas, ni segundas fases, lo cual le hace ser en principio un material adecuado para aplicaciones biomédicas.

La Figura 4.1.2 muestra la microestructura de la aleación AZ31. Se pueden observar granos homogéneos, con un tamaño medio de 25,7 μm , como resultado de una solución sólida uniforme, sin precipitados. Se presentan partículas de una fase rica en Mn (Al_6Mn), todavía remanentes después del procesado. Su fracción en volumen, determinada mediante técnicas de análisis de imagen se estima próxima a 3×10^{-3} [71].

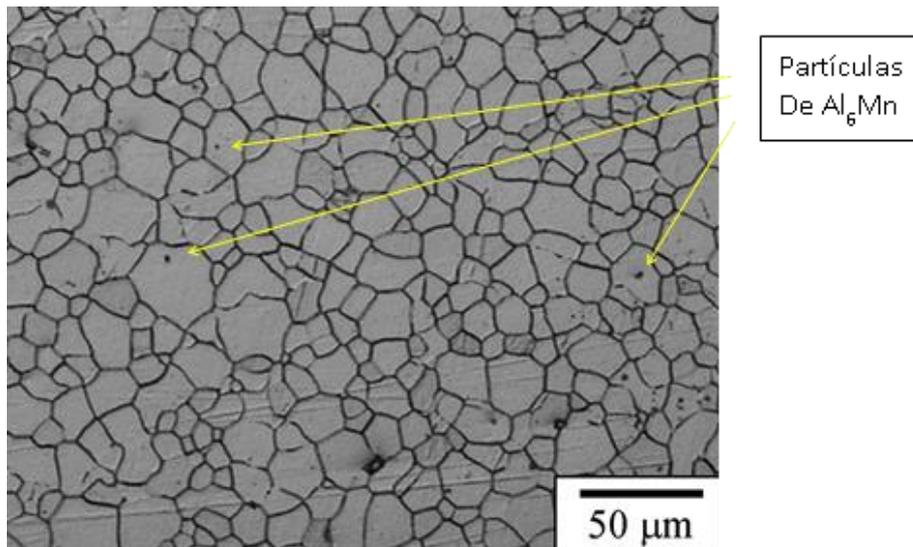


Figura 4.1.2 Microestructura de la aleación AZ31. Se indican algunas partículas ricas en Mn (Al_6Mn), presentes en la muestra.

4.1.2 Comportamiento mecánico

La Figura 4.1.3 muestra las curvas tensión-deformación obtenidas de los ensayos de tracción realizados en Mg PM, Mg colado y en la aleación AZ31.

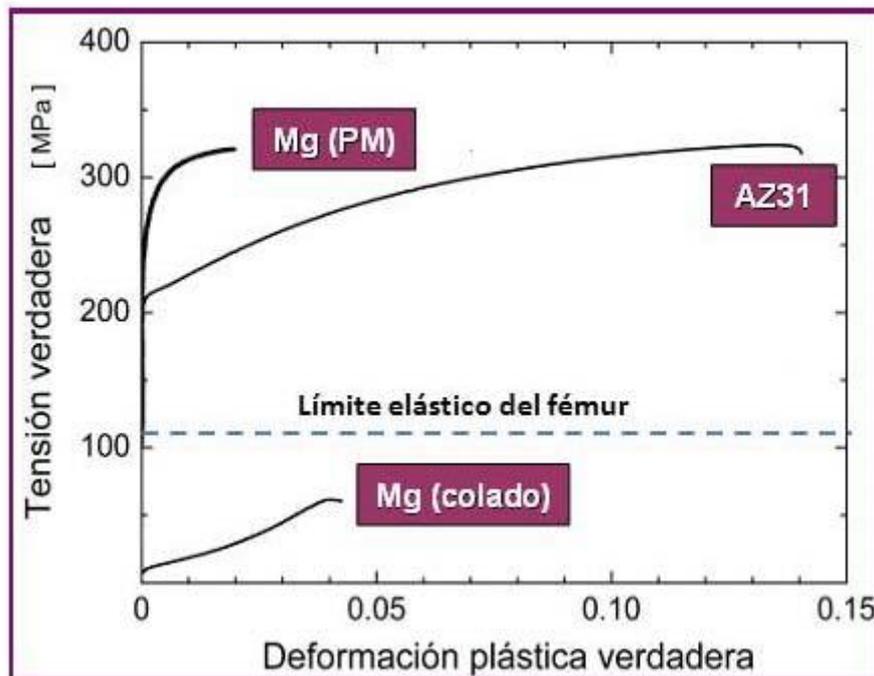


Figura 4.1.3 Curvas tensión-deformación, obtenidas mediante ensayos de tracción para los distintos materiales de base magnesio. $T^a = 300K$, $\epsilon = 10^{-3} s^{-1}$

El Mg PM presenta un 2% de ductilidad, un límite elástico (medido al 0.2% de deformación) de 280 MPa y una resistencia máxima de 320 MPa. La aleación AZ31, posee un tamaño de grano fino y una textura basal característica de la laminación, lo que le confiere un límite elástico de 230 MPa y una tensión máxima de 300 MPa. Ambos materiales superan en requisitos mecánicos al hueso [79]. Sin embargo el Mg colado se queda muy por debajo del límite elástico del fémur. En definitiva la resistencia mecánica de las muestras de Mg PM se compara favorablemente con la aleación AZ31 y es muy superior a la del magnesio puro colado. También como es habitual en materiales pulvimetalúrgicos, ocurre una disminución de la ductilidad en comparación a los materiales colados [82, 94].

4.1.3 Caracterización superficial

Composición mediante difracción de rayos X (DRX):

Mediante DRX se comprobó la estructura cristalina de los materiales desnudos, apareciendo únicamente los picos asociados a la estructura hexagonal del Mg, como puede apreciarse en la Figura 4.1.4 a) y b).

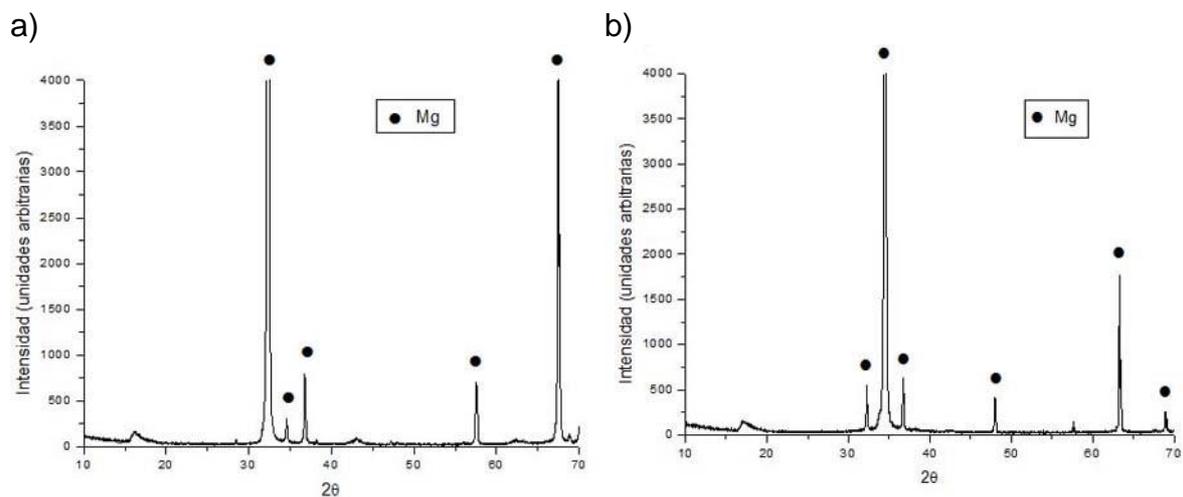


Figura 4.1.4 Espectros de difracción de rayos X en materiales sin recubrimiento: a) Mg y b) AZ31.

Por el contrario, el análisis por DRX de los materiales sometidos a la inmersión en HF dio lugar a la aparición en todos ellos de picos asignados al Mg y al MgF_2 , como muestra la Figura 4.1.5:

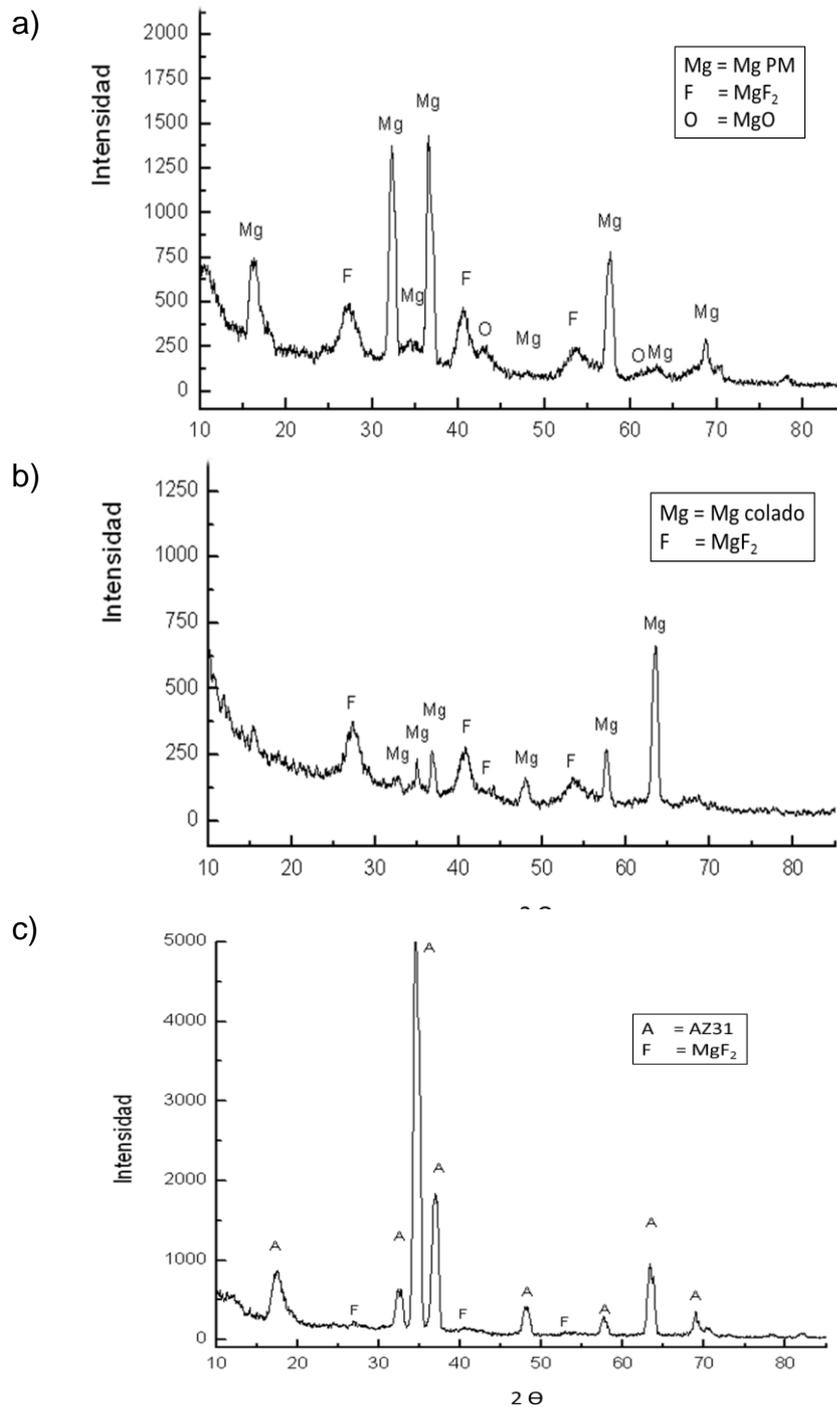
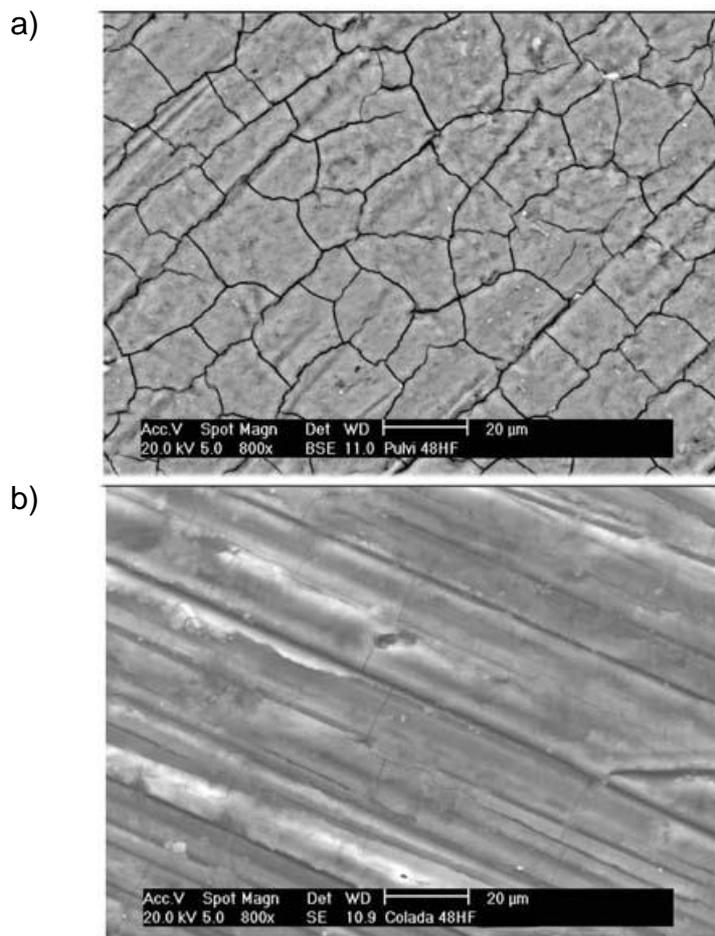


Figura 4.1.5 Espectros de difracción de rayos X en materiales tratados en HF: a) Mg PM, b) Mg colado y c) AZ31.

Además, se ha comprobado mediante análisis de XPS (Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X), que el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ también forma parte de estos recubrimientos. En nuestro caso aparece MgO en el Mg PM (Figura 4.1.5 a)

Topografía mediante microscopio electrónico de barrido (MEB):

La figura 4.1.6 muestra la topografía superficial del recubrimiento de MgF_2 sobre los distintos sustratos: Mg PM, Mg colado y AZ31. En el caso del Mg PM (a), el recubrimiento muestra un agrietamiento considerable, que parece seguir los defectos y discontinuidades del material base. En el Mg colado (b) y la AZ31 (c) se aprecian las líneas de desbaste del material base producidas por el lijado, lo que puede indicar el pequeño espesor del recubrimiento.



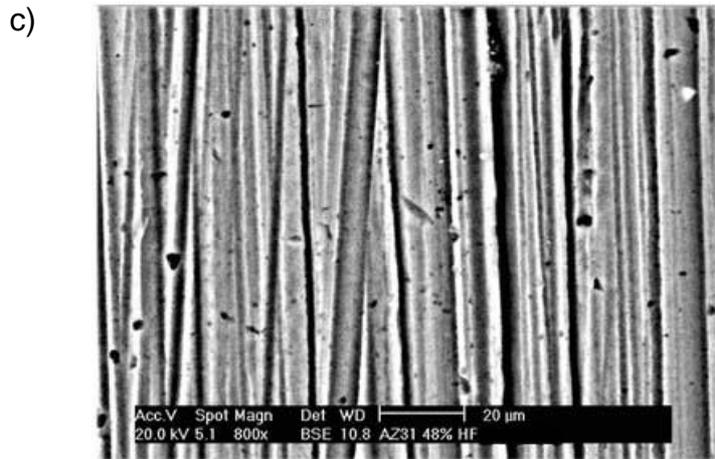
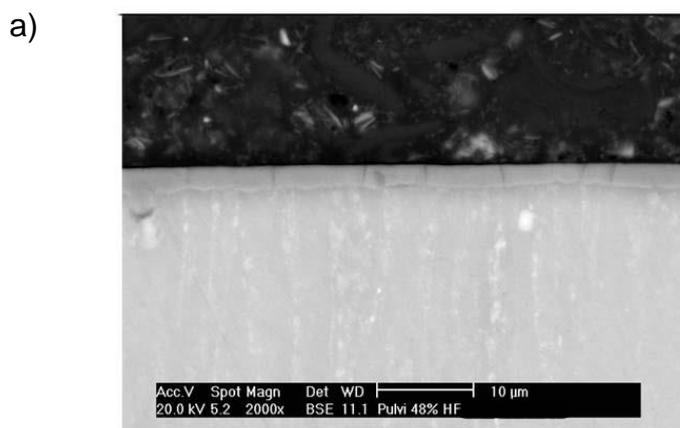


Figura 4.1.6 Aspecto del recubrimiento de MgF_2 sobre : a) Mg PM; b) Mg colado y c) AZ31.

El recubrimiento sobre los materiales de Mg puede ser observado también mediante corte transversal de las muestras. La Figura 4.1.7 muestra la capa formada sobre a) Mg PM, b) Mg colado y c) AZ31. En todos los casos el espesor de capa es similar. En el Mg PM se puede observar un mayor número de grietas transversales que atraviesan el recubrimiento hasta llegar al sustrato base. En los tres materiales se aprecia la buena adherencia y la uniformidad del recubrimiento a lo largo de toda la superficie.



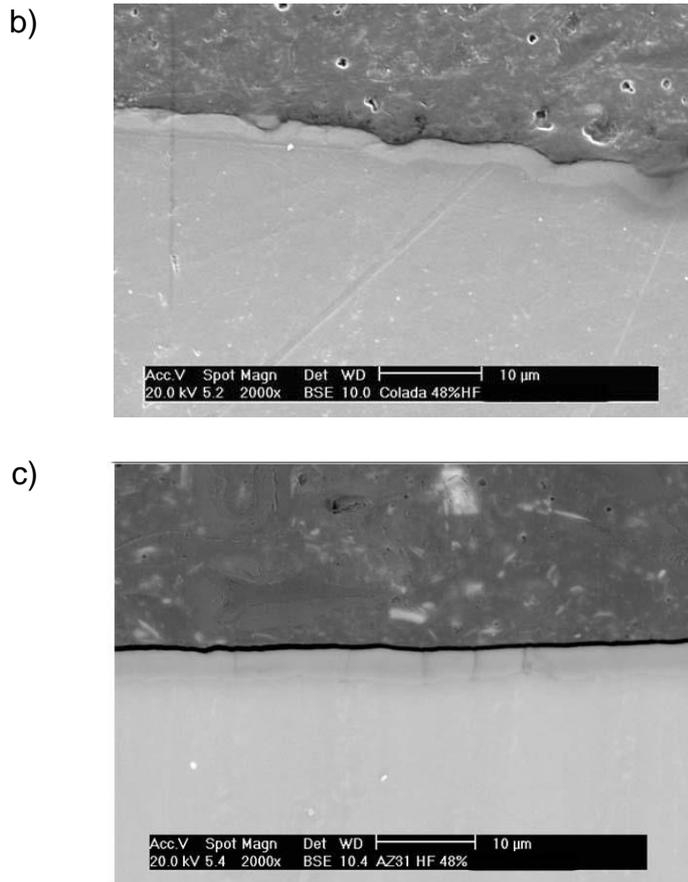


Figura 4.1.7 Imágenes de SEM de cortes transversales del recubrimiento de MgF_2 sobre: a) Mg PM; b) Mg colado; c) AZ31.

A continuación se evaluó el comportamiento a corrosión de estos recubrimientos con respecto a los materiales en estado de recepción.

4.1.4 Corrosión de los materiales de Mg en estado de recepción y con recubrimiento de MgF_2

Sonda Kelvin de barrido (SKP):

La Figura 4.1.8 muestra los mapas de potencial obtenidos después de 6 horas de exposición a un ambiente con humedad relativa superior al 95%, correspondientes a los tres materiales de base Mg ensayados, bien desnudos o

bien recubiertos de la capa de MgF_2 . Los resultados de SKP muestran que, en estado de recepción (Figura 4.1.8 a y b), el Mg puro es electroquímicamente activo en ambientes húmedos como revela la electronegatividad de sus potenciales de superficie, que se hallan en el rango entre -0,3 y -0,4 V. Comparando Mg PM y colado nos encontramos con que el colado tiene potenciales ligeramente superiores al PM. Por otra parte en el material que ha sido recubierto (Figura 4.1.8 d y e), el potencial aumenta considerablemente hasta 1 V. Estos resultados confirman el poder protector de la capa de MgF_2 sobre la superficie del Mg.

Respecto a la aleación AZ31 en estado de recepción (Figura 4.1.8 c), se obtienen superficies equipotenciales con valores cercanos a los 0,3 V, ya de por sí muy superiores a los de los materiales de Mg puro. Tras el tratamiento en HF (Figura 4.1.8 f), estos valores se incrementan notablemente en la AZ31 hasta los 0,8 V. Este aumento hacia valores más positivos indica que la capa de MgF_2 está ofreciendo una protección añadida a la aleación AZ31 [71, 78].

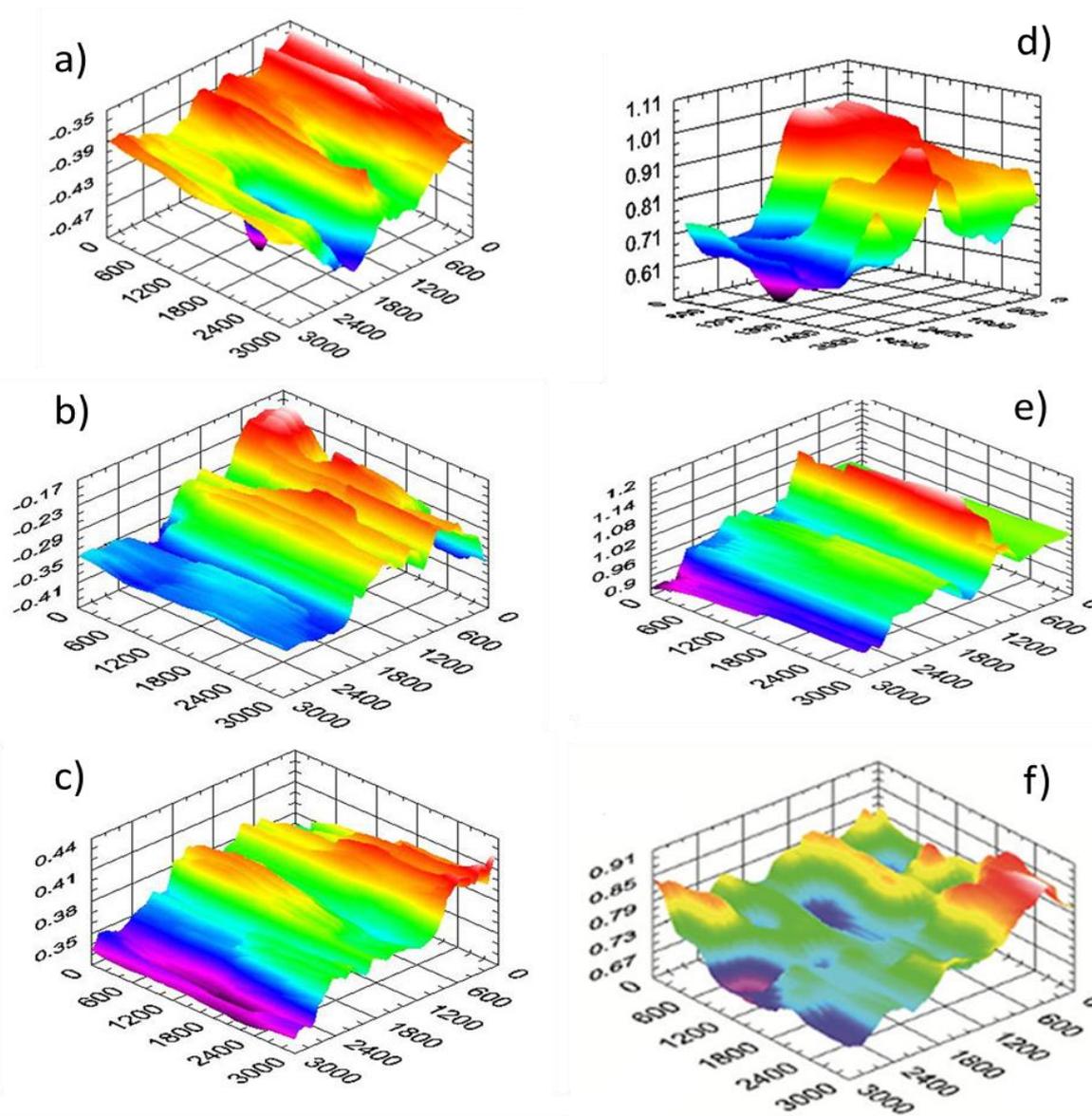


Figura 4.1.8 Mapas de potencial obtenidos por SKP para los materiales en estado de recepción: **a)** Mg PM, **b)** Mg colado, **c)** AZ31; y con recubrimiento de MgF₂: **d)** Mg PM, **e)** Mg colado, **f)** AZ31. El eje vertical representa los valores de potencial en voltios (V) respecto al electrodo estándar de hidrógeno (SHE). Los ejes X e Y representan el área barrida (en μm).

Después del estudio termodinámico por SKP se evaluó la cinética de corrosión de estos materiales (en estado de recepción y con recubrimiento) en el medio fisiológico DMEM.

Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS):

Previo a las medidas de impedancia se registró la variación con el tiempo de los valores del potencial de corrosión (E_{corr}) de los tres materiales, tanto desnudos como recubiertos, en medio de cultivo DMEM.

La Figura 4.1.9 muestra el seguimiento del potencial de corrosión (E_{corr}) durante los 11 días de duración del estudio.

En los tres materiales se produce el mismo fenómeno: el potencial de corrosión de las muestras en estado de recepción se ennoblece mediante la formación de una capa de MgF_2 en su superficie. Los valores de E_{corr} aumentan en unos 200 mV el primer día, mostrando una lenta tendencia a disminuir según aumenta el tiempo de inmersión en DMEM. A los 11 días la diferencia se redujo a unos 25 ó 50 mV, aún favorable a los materiales recubiertos.

Las oscilaciones observadas en los primeros días en los tres materiales con recubrimiento pueden deberse a las alteraciones de la capa de MgF_2 debidas a la presencia de grietas. El ascenso en los valores de E_{corr} que se produce el primer día, tanto en el Mg PM como en el Mg colado en estado de recepción, está relacionado con la deposición de productos de corrosión sobre su superficie, debido a la alta reactividad de ambos materiales cuando se hallan inmersos en medio de cultivo DMEM. Este efecto es mucho menos marcado en la AZ31, que muestra una mayor resistencia a la corrosión debido a su capa de pasivado.

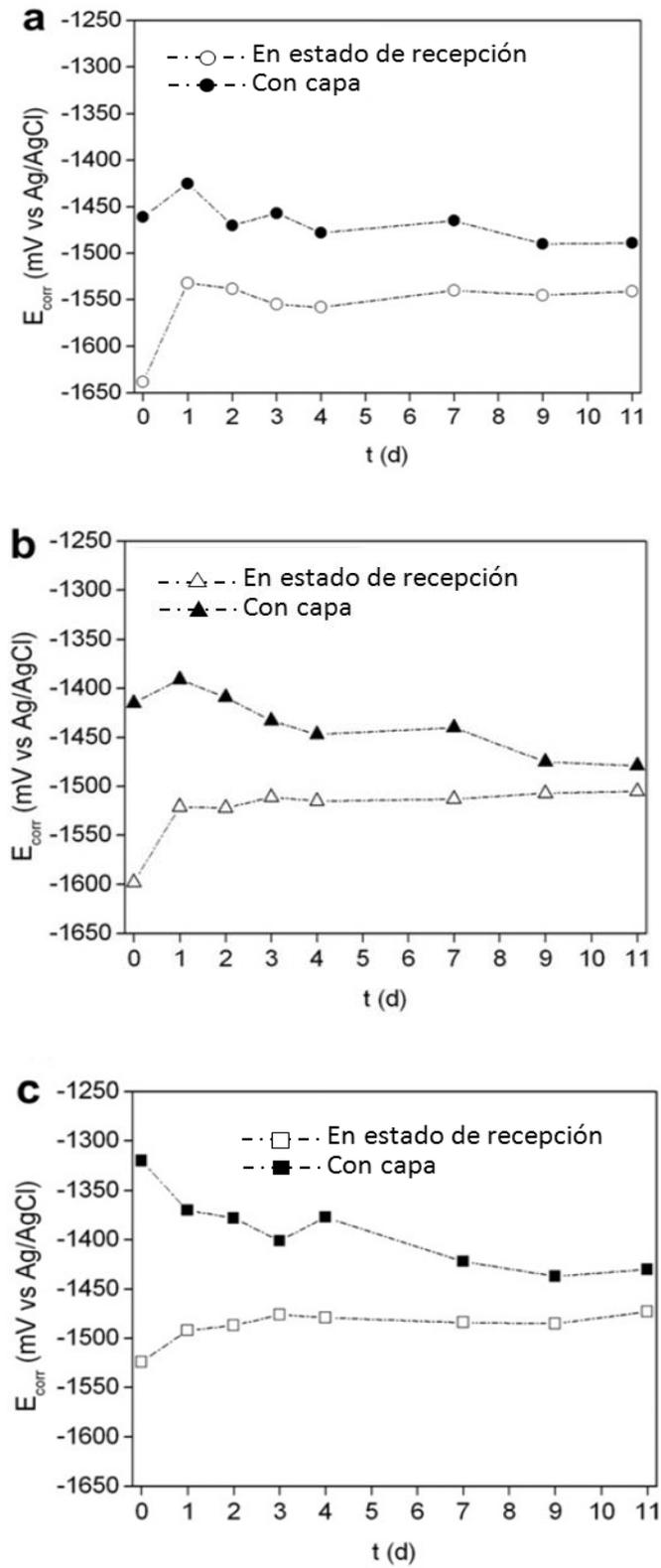


Figura 4.1.9 Evolución temporal del potencial de corrosión en estado de recepción y con recubrimiento de MgF_2 de **a)** Mg PM, **b)** Mg colado y **c)** AZ31.

La Figura 4.1.10 muestra, para un mismo tiempo de ensayo, la resistencia frente a la corrosión obtenida en medio DMEM mediante la medida del diámetro del semicírculo del diagrama de Nyquist. A mayor diámetro, mayor resistencia frente a la corrosión y por tanto menor velocidad de corrosión.

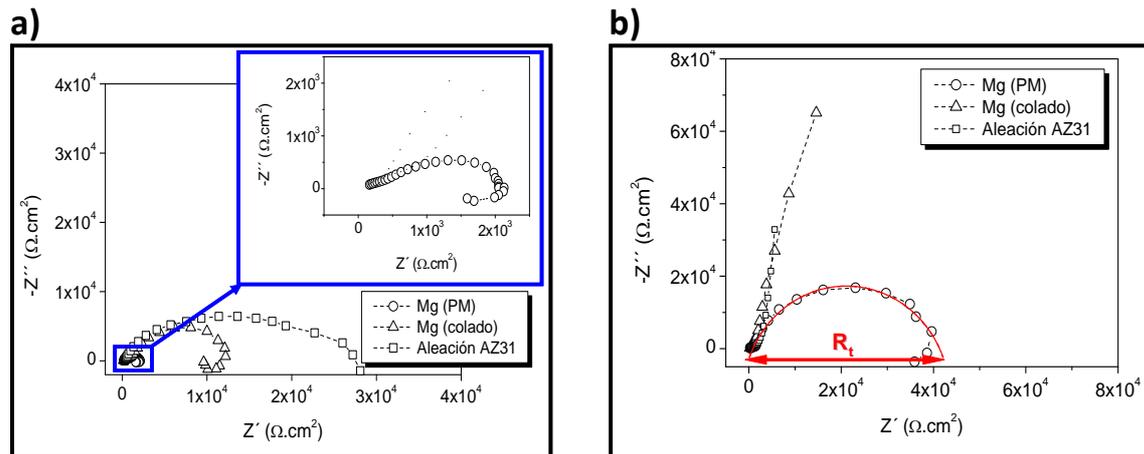


Figura 4.1.10 Diagramas de Nyquist tras 1 día en medio de cultivo DMEM, **a)** en estado de recepción y **b)** con recubrimiento de MgF_2 .

En la Figura 4.1.11 puede observarse la evolución de los diagramas de Nyquist con el tiempo para los tres materiales en estudio, con y sin recubrimiento, en medio DMEM.

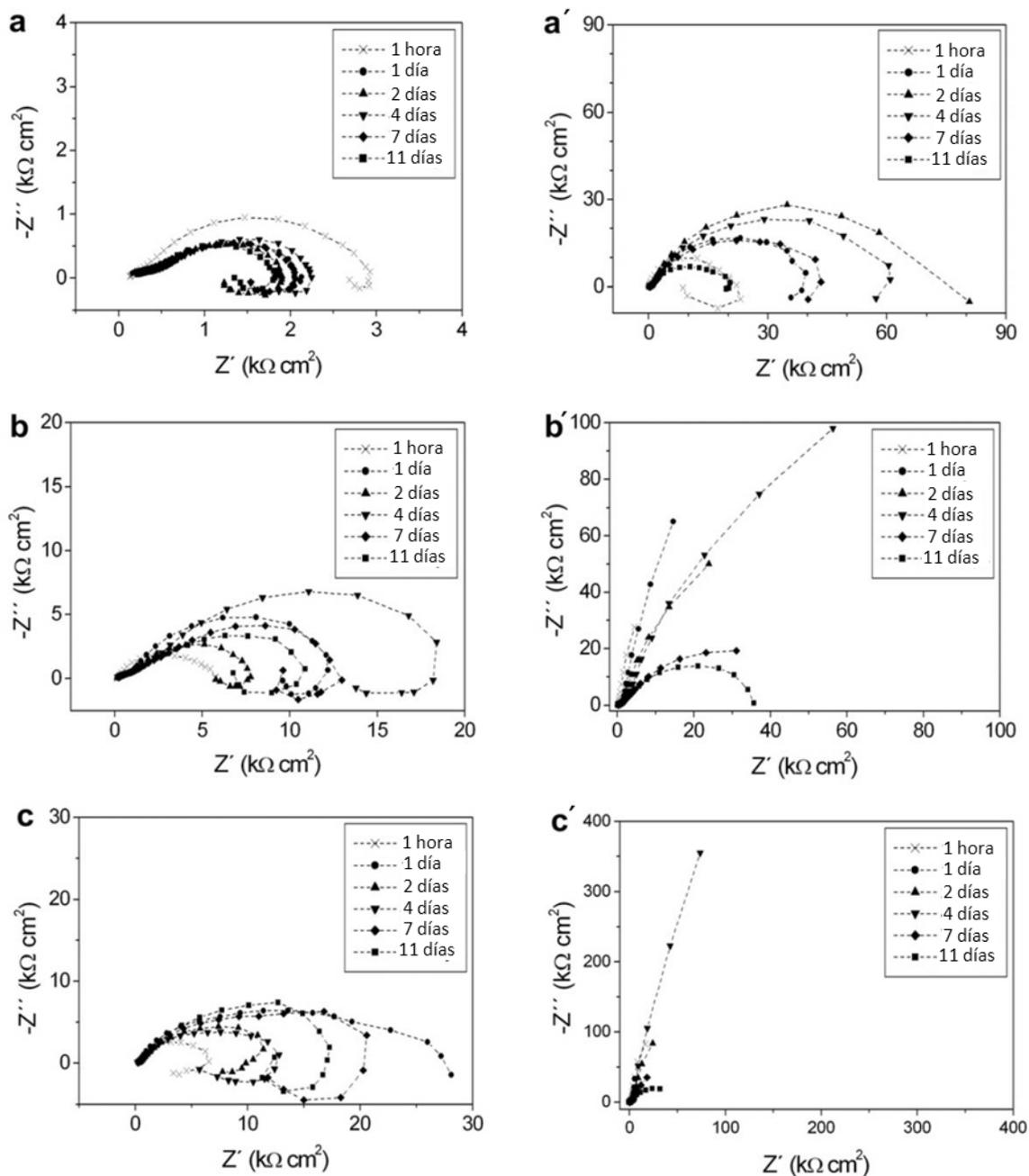


Figura 4.1.11. Diagramas de Nyquist en medio de cultivo DMEM, *columna izqda.)* en estado de recepción y *columna dcha.)* con recubrimiento de MgF_2 ; **a) y a')** Mg PM, **b) y b')** Mg colado, **c) y c')** AZ31.

Comparativamente (Figura 4.1.11 a, b y c) se puede apreciar que las muestras de Mg PM muestran la resistencia frente a la corrosión más baja en DMEM, como se puede deducir de los arcos capacitivos que presentan

diámetros un orden de magnitud más pequeños que los de las muestras de Mg colado y de AZ31. En todos los materiales de magnesio, cuando éstos se encuentran recubiertos, la resistencia frente a la corrosión aumenta (compárense las Figuras 4.1.11 a, con a', b con b' y c con c'). Este hecho revela que el recubrimiento ofrece protección con respecto a los materiales desnudos. No obstante, esta protección va desapareciendo a medida que transcurre el tiempo de inmersión en el medio corrosivo, como puede deducirse de la disminución en los diámetros de los diagramas de impedancia con el tiempo, debido al ingreso paulatino del medio de cultivo a través de las grietas del recubrimiento hasta alcanzar el substrato base.

La Figura 4.1.12 ofrece los valores de densidad de corriente de corrosión (I_{corr}) de los tres materiales ensayados, tanto con recubrimiento de MgF_2 como sin él, tras 7 días en medio de cultivo DMEM. La I_{corr} se calculó como BR^{-1} , donde B toma un valor constante de 26 mV (en los materiales desnudos activos) y un valor de 52 mV (en los recubiertos, con comportamientos más parecidos a los de un estado pasivo). R es el diámetro del semicírculo de los diagramas de Nyquist, y corresponde a la resistencia de transferencia, o resistencia frente a la corrosión ($K\Omega cm^{-2}$).

En la misma Figura se puede observar también cómo la velocidad de corrosión (proporcional a la I_{corr}) es significativamente mayor en el Mg PM, con y sin recubrimiento, con respecto al Mg colado y a la aleación AZ31. Estos últimos materiales cuando están protegidos con la capa de fluoruro de magnesio muestran cinéticas de corrosión parecidas con valores por debajo de $2 \mu A cm^{-2}$.

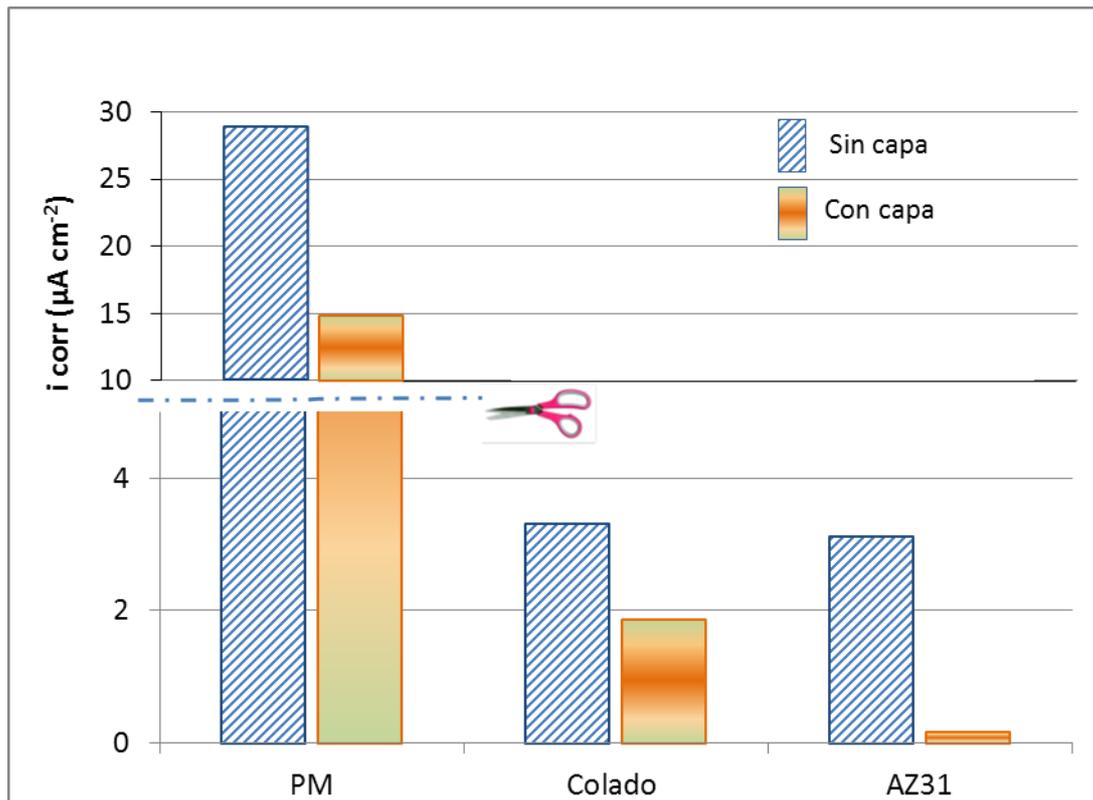


Figura 4.1.12. Valores de densidad de corriente de corrosión de los tres materiales de Mg, con y sin capa de MgF_2 , tras 7 días en DMEM.

4.2 ENSAYO DE BIOCOMPATIBILIDAD EN CULTIVO CELULAR

En la Figura 4.2.1 pueden verse células MC3T3-E1 y L929 creciendo sobre el material de AZ31 con capa, tras 7 días de cultivo:

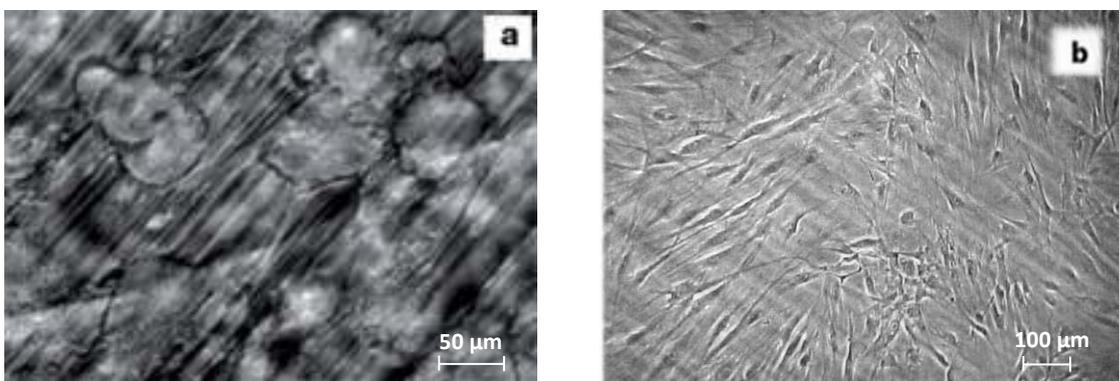


Figura 4.2.1 Cultivos de pre-osteoblastos MC3T3-E1 (a) y fibroblastos L929 (b) mantenidos durante 7 días sobre probetas de AZ31 con recubrimiento de MgF_2 .

La Figura 4.2.2 muestra los resultados del conteo de células presentes en las placas tras los 7 días de cultivo. Puede comprobarse que ambos tipos celulares han experimentado crecimientos notables, lo que es indicativo de la buena aceptación del material por parte de las células. Las diferencias son significativas tanto para pre-osteoblastos como para fibroblastos, siendo los incrementos respectivamente de 15 y 31 veces respecto del original.

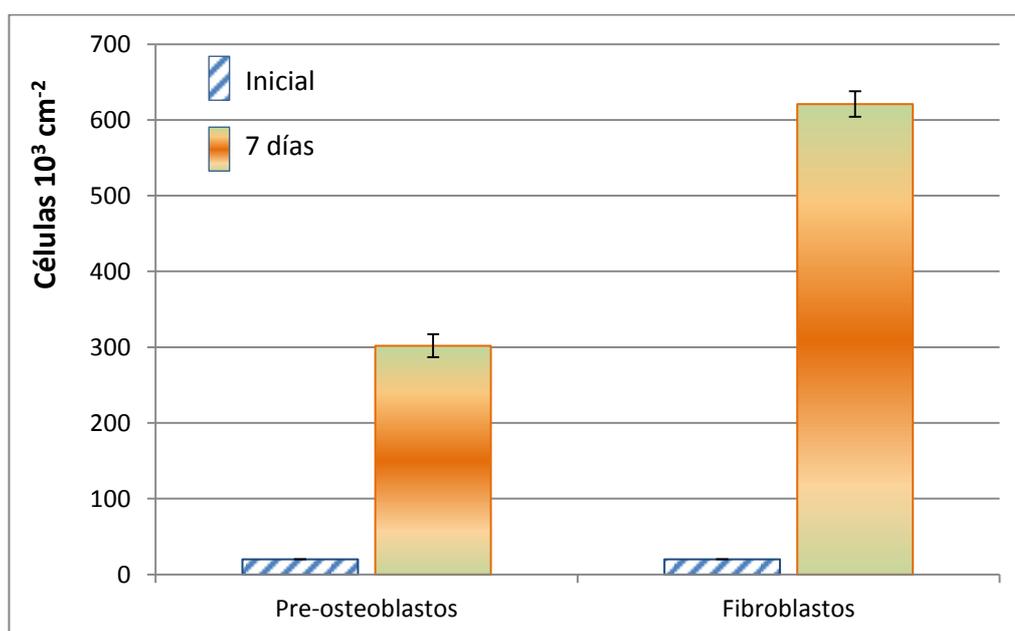


Figura 4.2.2 Cultivos de pre-osteoblastos MC3T3-E1 y fibroblastos L929, mantenidos durante 7 días sobre probetas de AZ31 con recubrimiento de MgF_2 . Las células fueron sembradas a una densidad de $20 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$.

Tras los 7 días de cultivo, las células fueron desprendidas con tripsina y se incubaron con yoduro de propidio, con el fin de evaluar el porcentaje de ellas que seguían siendo viables. El citómetro de flujo es capaz de separar las poblaciones de células según muestren respuesta del yoduro de propidio cuando es excitado por un láser, como puede verse en la Figura 4.2.3:

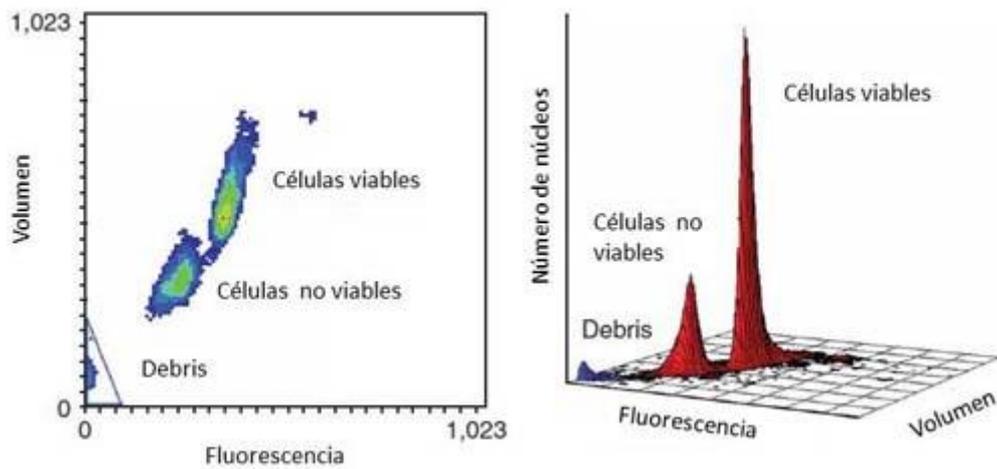


Figura 4.2.3 Capacidad de discriminación de poblaciones celulares de la citometría de flujo en función de la respuesta en la emisión de un fluoróforo.

La cuantificación del número de células viables para los controles crecidos en una placa sin probeta de AZ31 y las que fueron sembradas sobre el material, puede estudiarse en la Figura 4.2.4:

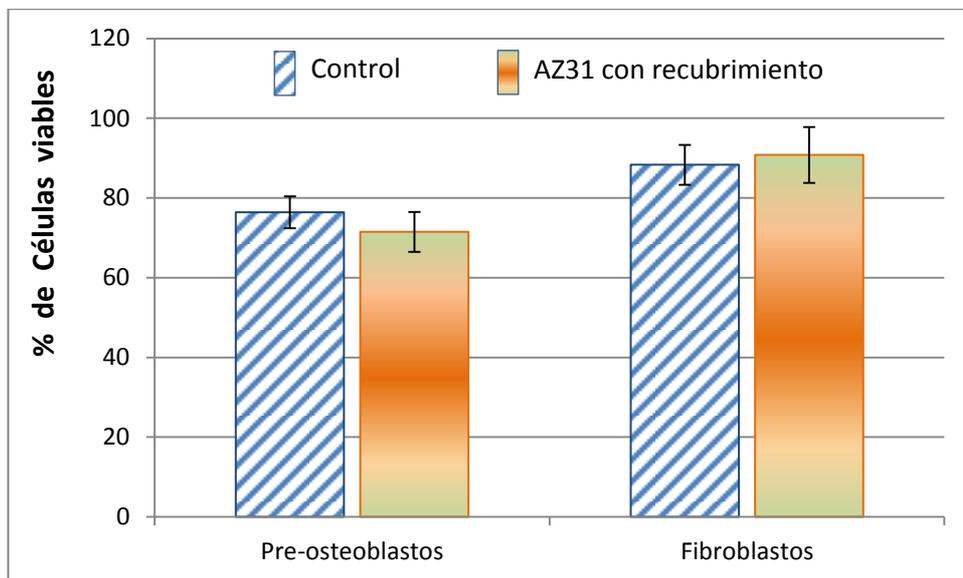


Figura 4.2.4 Resultados de viabilidad celular obtenidos por permeabilidad al yoduro de propidio.

Como podemos observar, la viabilidad de las células crecidas sobre probetas de AZ31 con recubrimiento es equiparable a la de los controles en placas de cultivo vacías, indicativo de la buena biocompatibilidad de esta aleación con recubrimiento.

Hasta este punto se ha llevado a cabo un amplio proceso de caracterización previa del material AZ31. Los resultados de esta fase ofrecen un respaldo para iniciar su ensayo en un modelo animal *in vivo*:

4.3 EFECTOS LOCALES DE LA CORROSIÓN DEL IMPLANTE

4.3.1 Estudio de biodegradación del implante y reparación del hueso mediante técnicas no invasivas

Estudio cualitativo:

En las imágenes que se muestran a continuación, obtenidas mediante tomografía, puede observarse la evolución que experimenta el implante a lo largo de 13 meses de inserción en el fémur, la formación de bolsas de gas y la reparación del hueso en los casos en que fue fracturado.

En primer lugar, en la Figura 4.3.1, se muestra la excelente definición que ofrece la tomografía. En la imagen de la izquierda se puede apreciar el contorno de un fémur normal, con sus corticales intactas y un espacio entre ellas donde se encuentra la médula ósea. En la imagen situada a la derecha, puede apreciarse que en el espacio intramedular se ha alojado un implante de AZ31, el cual aparece en un tono ligeramente menos brillante que el hueso.

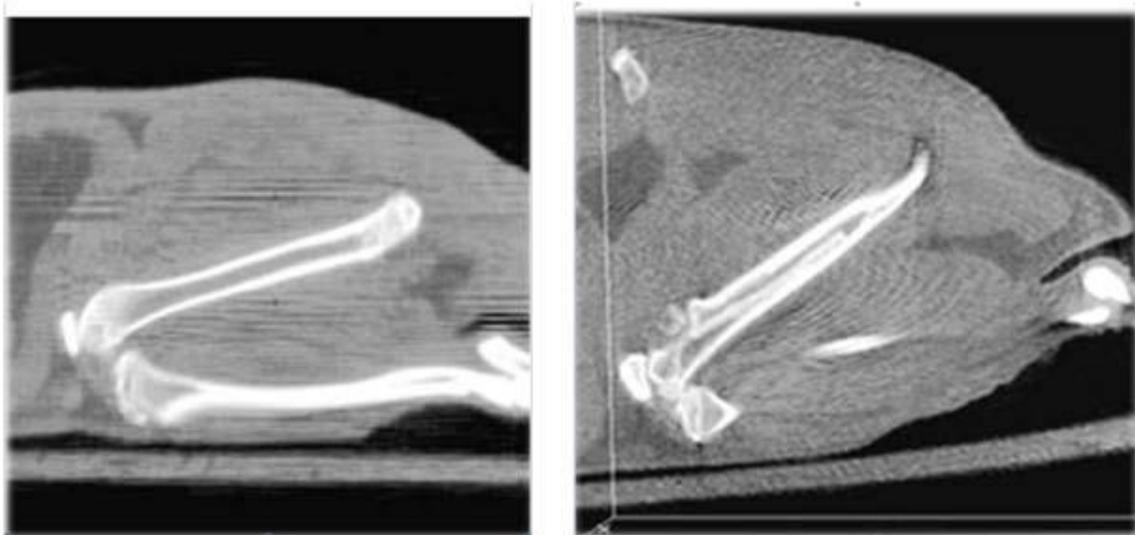


Figura 4.3.1 *Imágenes de tomografía donde puede apreciarse el fémur de una rata control (izq.) y el de una rata portadora de implante de AZ31 (dcha.).*

Además del clavo intramedular, el otro sistema más empleado de fijación de las dos partes de un hueso fracturado son las placas. Una inserción de prueba de este tipo de implante al mes de la cirugía, como se muestra en la Figura 4.3.2:

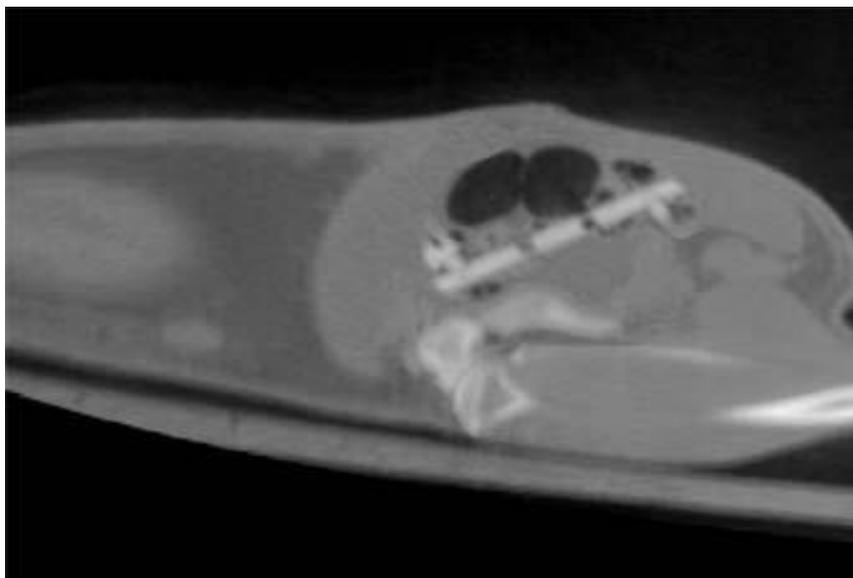


Figura 4.3.2 *Imágenes de tomografía donde puede apreciarse una rata a la que se ha insertado una placa de AZ31. Destaca el importante volumen de gas generado (en color negro).*

En ella puede observarse con claridad la placa (en corte sagital), con un tornillo de fijación en cada extremo. El aspecto más relevante de esta imagen es la presencia de una bolsa de gas de grandes dimensiones alojada en los tejidos que rodean al implante. Esta gran cantidad de gas producida nos llevó a descartar este sistema de fijación y de limitar toda la experimentación al implante tipo clavo intramedular, ya que, como se verá más adelante, aunque también se produce gas, la cantidad generada es mucho menor.

De este grupo de experimentos se pudo concluir que la tomografía es una técnica que ofrece imágenes de suficiente resolución y definición como para ser empleada en el seguimiento de la biodegradación del implante y para estudiar la reparación de la fractura ósea, en línea con lo ya manifestado en otros trabajos [95, 96].

La evolución temporal que sufre el implante de AZ31 en estado de recepción alojado en un fémur no fracturado puede apreciarse en la serie de imágenes de la Figura 4.3.3, correspondientes a 1, 2, 4, 6, 9 y 13 meses.

En ellas puede advertirse cómo el implante, claramente delimitado en el primer mes, va desdibujándose gradualmente hasta volverse cada vez menos nítido y también cómo en el primer mes destaca el gas alojado, que aparece en color oscuro rodeando al implante y cómo va desapareciendo hasta no ser apreciable de forma visual desde el sexto mes en adelante.



Figura 4.3.3 *Imágenes de tomografía donde puede apreciarse la evolución del implante de AZ31 en fémures no fracturados, correspondientes a 1, 2, 4, 6, 9 y 13 meses.*

La evolución del implante de AZ31 en estado de recepción en un fémur que ha sufrido fractura puede contemplarse en la Figura 4.3.4, con imágenes igualmente adquiridas a 1, 2, 4, 6, 9 y 13 meses. A partir del cuarto mes se forma el callo de fractura, como paso intermedio en el proceso de su sanado. A partir del sexto mes, la fractura aparece ya totalmente consolidada. Como detalle

interesante, que sucede en la rata, pero no en humanos, se forma una doble cortical en el interior del fémur.

Las imágenes de 9 y 13 meses, demuestran el proceso de remodelación ósea tras la consolidación de la fractura.

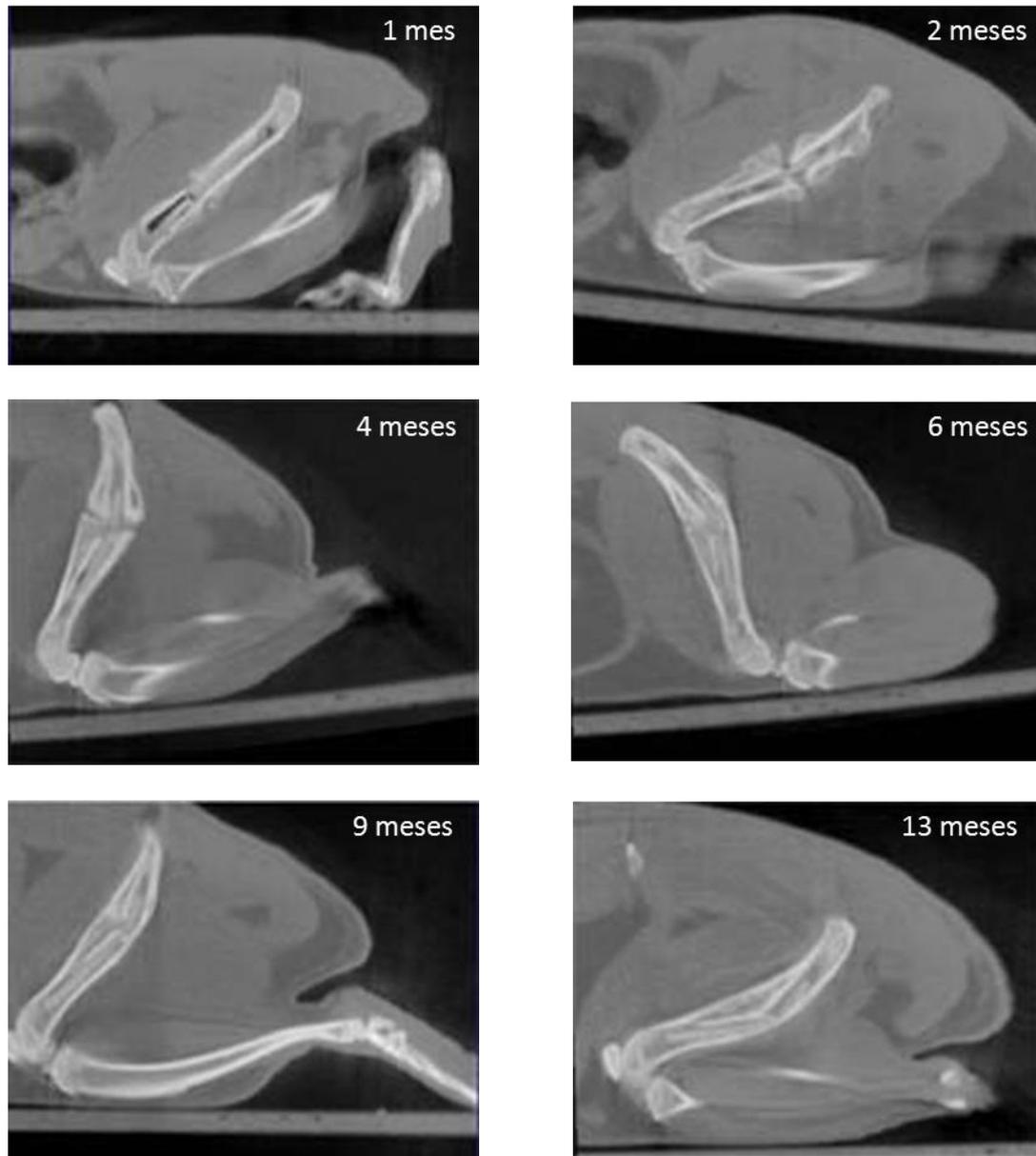


Figura 4.3.4 Imágenes de tomografía donde puede apreciarse la evolución del implante de AZ31 en fémures a los que se indujo fractura.

Estudio cuantitativo:

Las imágenes obtenidas mediante tomografía han sido empleadas para generar un modelo tridimensional mediante el programa informático ITK-SAP [85]. Los volúmenes correspondientes a burbujas de gas o al implante más los productos de corrosión depositados sobre su superficie en todas las condiciones estudiadas pueden de esta forma ser cuantificados, como puede apreciarse en la Figura 4.3.5:

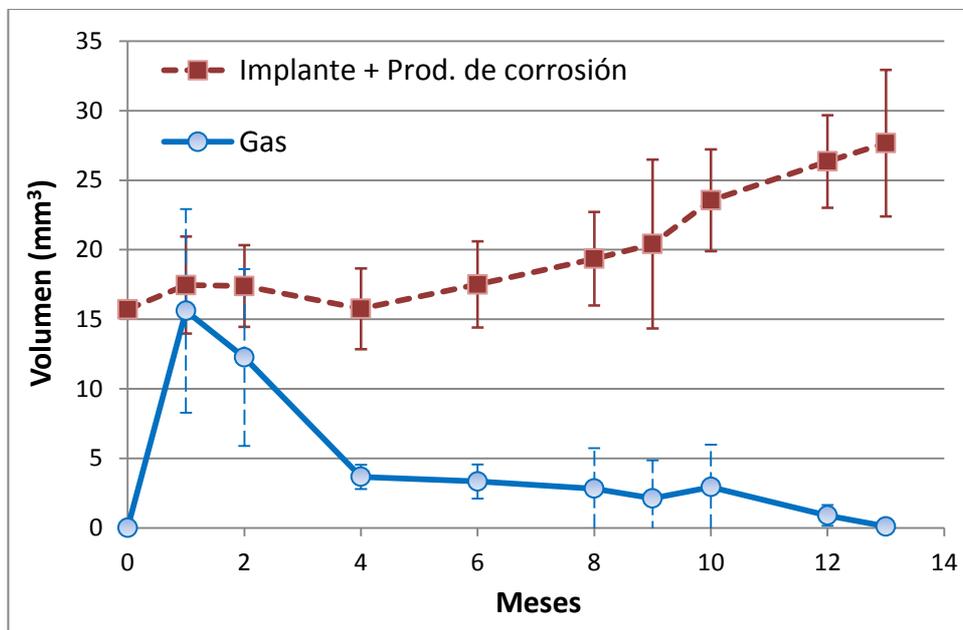


Figura 4.3.5 Evolución temporal de los volúmenes de gas y del implante de AZ31 más los productos de corrosión generados.

Se puede observar cómo a medida que transcurre el tiempo, el volumen del implante aumenta debido fundamentalmente a la deposición de productos de corrosión sobre la superficie. Estos depósitos frenan la velocidad de corrosión y por tanto disminuyen la generación de gas, lo que se refleja en su menor volumen.

Influencia de la Fractura:

La Figura 4.3.6 muestra la diferente evolución temporal en la formación de productos de corrosión dependiendo de si los fémures sufrieron o no fractura. Se puede observar cómo la presencia de la fractura favorece la formación de productos de corrosión sobre el implante.

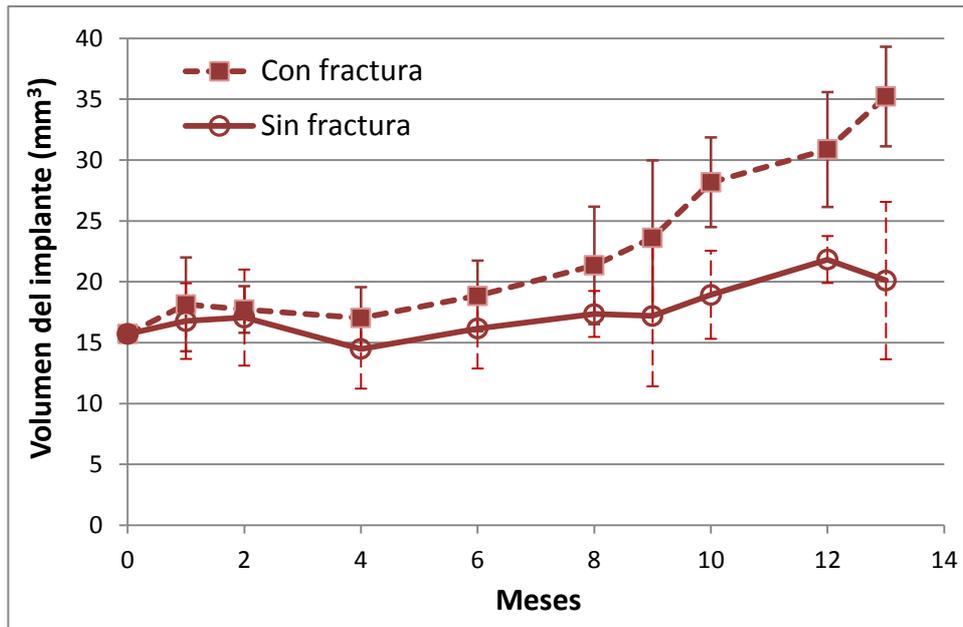


Figura 4.3.6 Evolución temporal del volumen del implante de AZ31 más los productos de corrosión generados en fémures con y sin fractura.

La Figura 4.3.7 muestra la diferente evolución temporal en la formación de gas dependiendo de si los fémures sufrieron o no fractura. La presencia de la fractura favorece la difusión del gas hacia los tejidos circundantes, siendo el organismo capaz de absorber más eficientemente el gas formado a partir del cuarto mes.

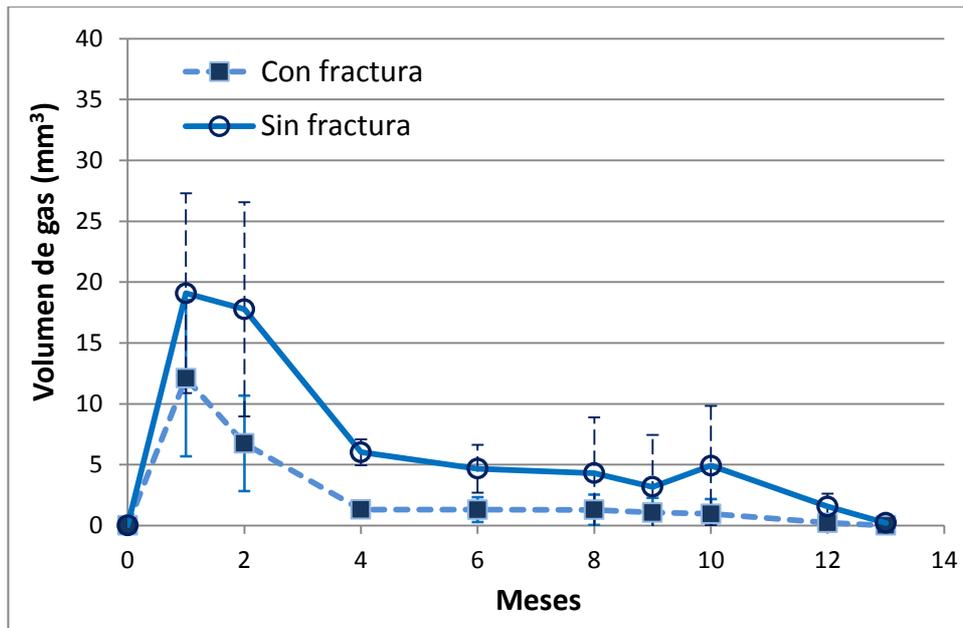


Figura 4.3.7 Evolución temporal del volumen de gas en fémures con y sin fractura.

Influencia del recubrimiento de MgF₂:

Respecto a la influencia del tratamiento de conversión del implante en HF, como se puede advertir en las Figuras 4.3.8 y 4.3.9, no se encuentran diferencias significativas en la variación del volumen del implante ni en la del gas, aunque el volumen del implante y sus productos de corrosión es algo mayor en los primeros meses para las ratas con implantes sin capa de MgF₂, para después invertirse la tendencia. La producción de gas es ligeramente superior en los primeros meses en el grupo de animales cuyos implantes no llevaban una capa de MgF₂. Estos resultados parecen indicar que el recubrimiento de MgF₂ podría retrasar ligeramente la corrosión del implante de AZ31 hasta transcurrido un tiempo suficiente para la consolidación de la fractura del hueso, pero a partir del cuarto mes, el volumen del implante aumenta y el gas acumulado disminuye debido al efecto barrera ejercido por los productos de corrosión hasta el final de la experimentación.

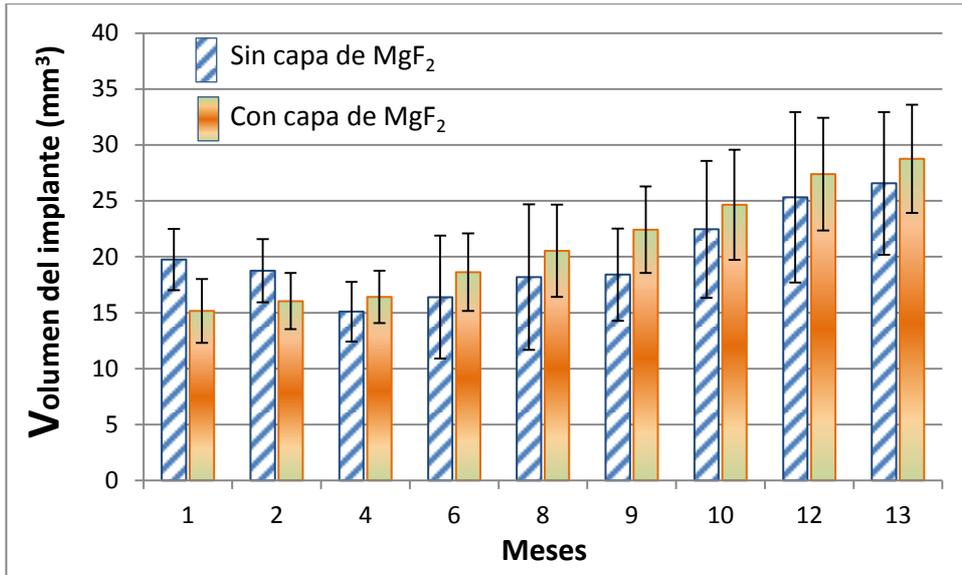


Figura 4.3.8 Evolución del volumen del implante más los productos de corrosión. Comparativa entre con y sin recubrimiento de MgF₂.

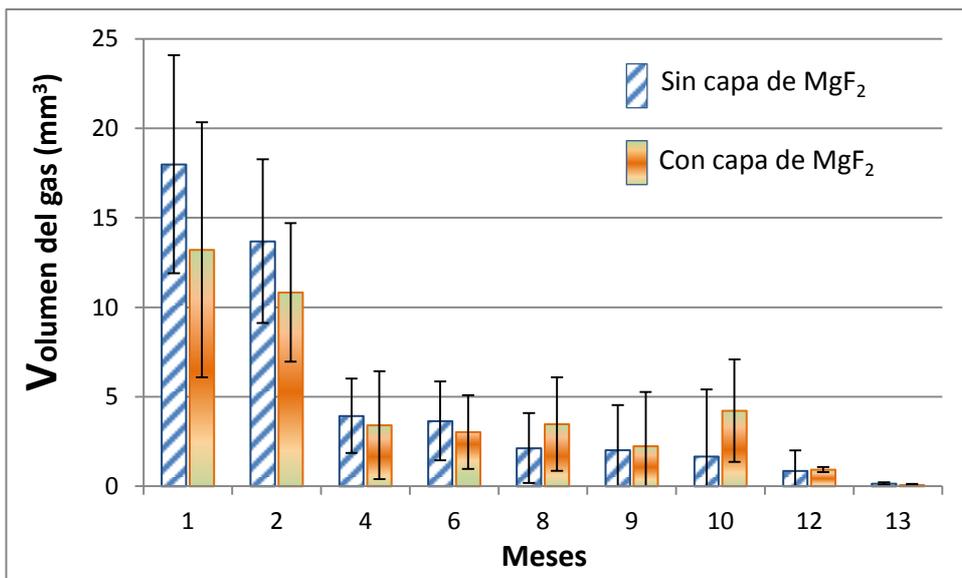


Figura 4.3.9 Evolución de la producción de gas. Comparativa entre con y sin recubrimiento de MgF₂.

En este punto es necesario regresar a la Figura 4.3.6 y preguntarse si las diferencias observadas entre con y sin fractura a partir de los 10 meses, se deben realmente a la influencia del factor fractura o si están enmascarando la

influencia subyacente del recubrimiento. Esta duda no se plantea respecto del volumen de gas, puesto que apenas hay diferencias relevantes entre con y sin fractura (Figura 4.3.6). La Figura 4.3.10 ayuda a dilucidar esta cuestión:

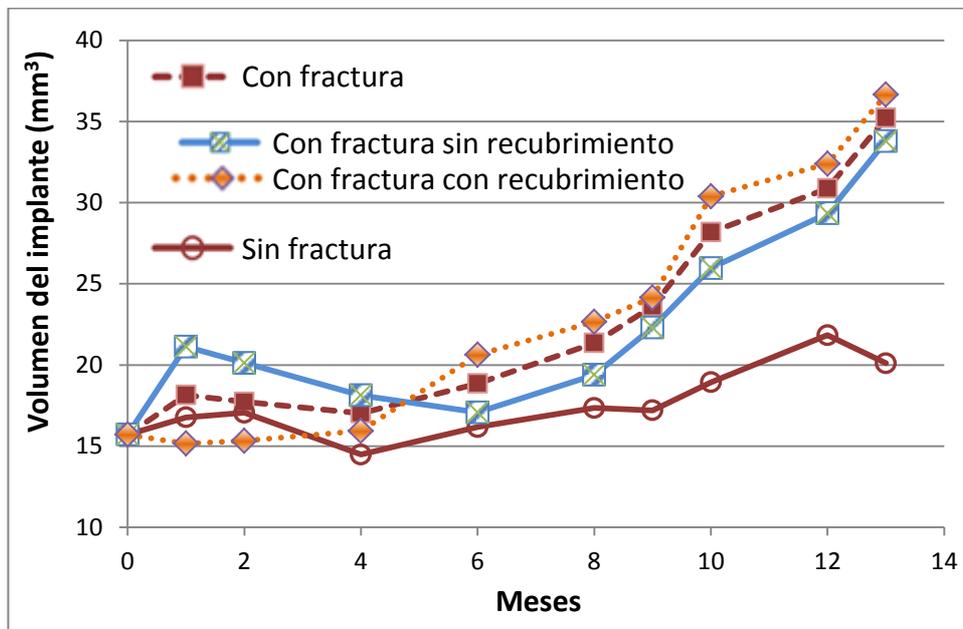


Figura 4.3.10 Evolución temporal del volumen de implante más productos de corrosión generados en el interior de fémures con fractura. Además se muestran los datos desglosados en implantes con y sin recubrimiento de MgF_2 .

El volumen del implante de AZ31 con recubrimiento no se altera significativamente hasta los 4 meses de implantación en huesos fracturados, a diferencia de los implantes de AZ31 en estado de recepción. Sin embargo, este efecto se invierte entre el cuarto y sexto mes, observándose que el volumen del implante de AZ31 aumenta tomando mayores dimensiones que si el implante no se encuentra recubierto. Este resultado indica que el recubrimiento en implantes de AZ31 en fémures fracturados frena la corrosión los primeros meses de consolidación de la fractura. Sin embargo, a tiempos más largos, la corrosión del mismo se acelera y es incluso ligeramente más rápida que en los implantes de

AZ31 en estado de recepción. En cualquier caso, la mayor corrosión observada en los implantes en fémures fracturados a partir del cuarto o sexto mes de implantación parece ser debida a la facilidad de ingreso de fluido sobre la superficie del material, lo que promueve una mayor velocidad de corrosión, independientemente de si el implante de AZ31 tiene o no recubrimiento.

4.3.2 Evolución de la biodegradación y reparación del hueso mediante histología e histomorfometría.

Durante todo el periodo de ensayo (1 a 13 meses) de la aleación AZ31, con y sin capa externa de MgF_2 , la implantación del material no produjo alteraciones clínicas como enrojecimiento o formación de ampollas de gas subdérmicas evidentes a simple vista ni muertes por embolia. Los animales a los que se les practicó una fractura de fémur no fueron inmovilizados, a resultas de lo cual mostraron una movilidad reducida las primeras 3 semanas tras la intervención sin que se apreciaran otras alteraciones en su comportamiento habitual, en consonancia con lo citado por otros autores [97].

Estudio **cuantitativo** mediante histología:

Una vez que las ratas fueron sacrificadas, con el fin de comparar los datos obtenidos mediante tomografía, se recurrió al análisis histológico para evaluar el proceso de biodegradación que experimentaron los implantes en el interior de la cavidad medular del fémur. La Figura 4.3.11 muestra imágenes de cortes transversales donde se puede observar el avance de la degradación del material del implante, según hayan transcurrido 1, 9 ó 13 meses desde su inserción

(imágenes a), b) y c) respectivamente). Cada pareja de imágenes muestra una vista de un corte transversal completo (izq.) y una ampliación de la zona central (dcha.) que permite una visualización con mayor detalle del implante.

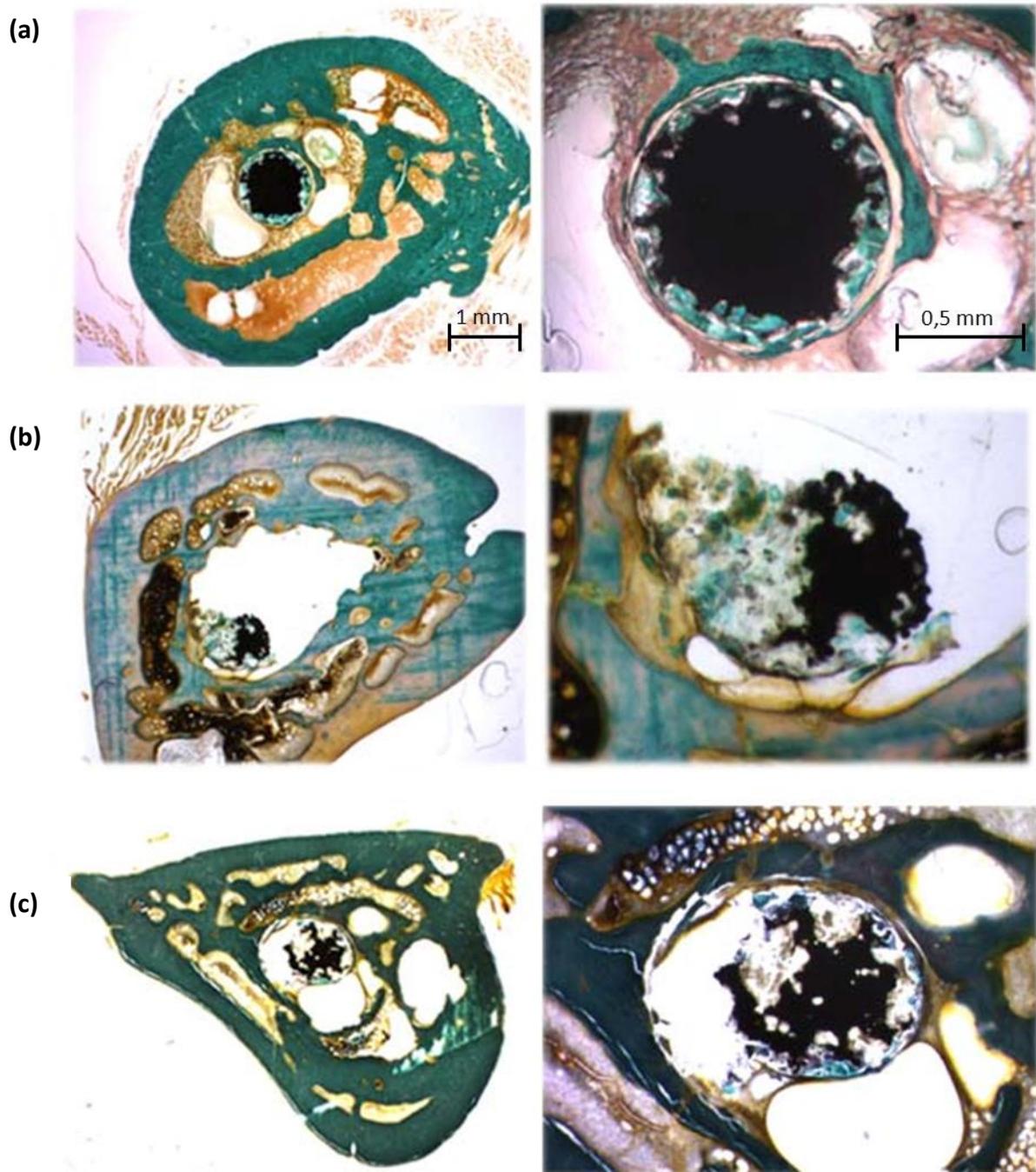


Figura 4.3.11 Parejas de imágenes de tinciones con tricrómicro de Masson, con distinta ampliación correspondientes a cortes transversales a 1 (a), 9 (b) y 13 (c) meses.

A medida que transcurre el tiempo, se puede apreciar el avance de la degradación del implante (en negro) debido a la corrosión por picaduras que presenta. El implante está rodeado por un delgado tejido conectivo que lo encapsula. Transcurridos 13 meses desde la inserción (c), el implante aparece ya muy biodegradado, con las trabéculas más engrosadas y unidas al hueso cortical (teñidos en verde). Es posible observar la rotura de la capa fibrosa que envolvía el implante en el lado inferior izquierdo. No se observan células de cuerpo extraño ni signos de inflamación.

Influencia del recubrimiento de MgF_2 :

De la Figura 4.3.12 a la Figura 4.3.18 se pueden observar imágenes teñidas con azul de toluidina correspondientes a 1, 9 y 13 meses de inserción y a implantes de AZ31 con y sin recubrimiento de MgF_2 .

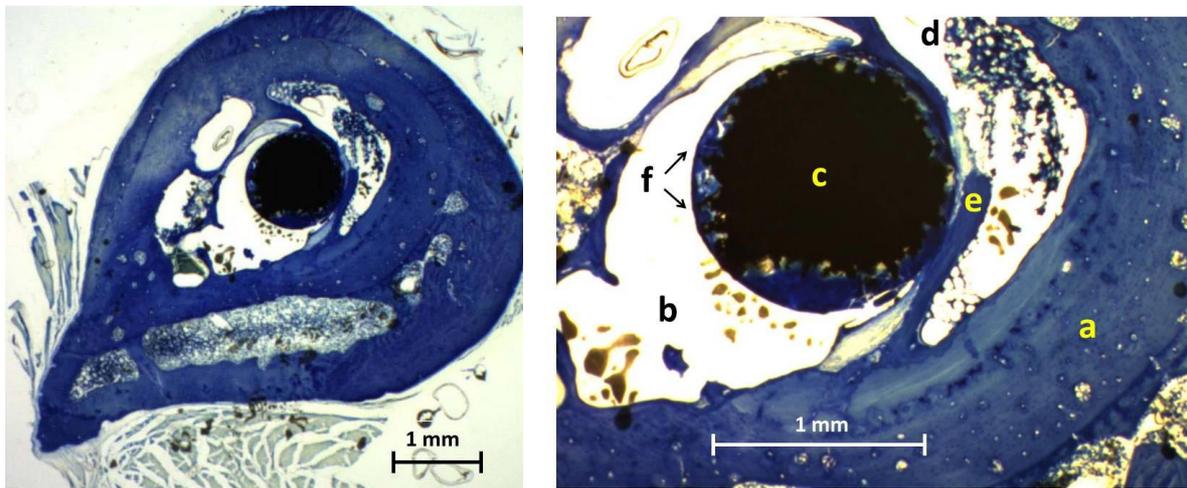


Figura 4.3.12 Imagen de tinciones con azul de toluidina una sección transversal correspondiente a 1 mes con implante de AZ31 sin recubrimiento de MgF_2 , en vista general (izq.) y aumentada (dcha.).

En la Figura 4.3.12 se puede apreciar imágenes de tinciones con azul de toluidina de secciones transversales correspondientes a 1 mes con implante de AZ31 sin recubrimiento de MgF_2 . En color azul el hueso compacto (a), que rodea a la cavidad medular (b) y en el centro, en color oscuro, se halla el implante (c), con bordes irregulares originados por la corrosión. En la cavidad medular permanecen algunos restos de médula ósea (d) y en algunos puntos hay trabéculas de hueso neoformado (e), dirigiéndose desde el endostio hacia el implante, el cual está rodeado por una delgada línea de tejido conectivo, que aparece en la imagen de color azul oscuro (f).

En la Figura 4.3.13 se muestra muy ampliado el límite entre el implante (c) y la delgada línea de tejido conectivo (f), para un implante de AZ31 con recubrimiento de MgF_2 tras 1 mes de inserción. La superficie del implante muestra signos de degradación, comenzándose a formar acúmulos de productos de degradación (g).

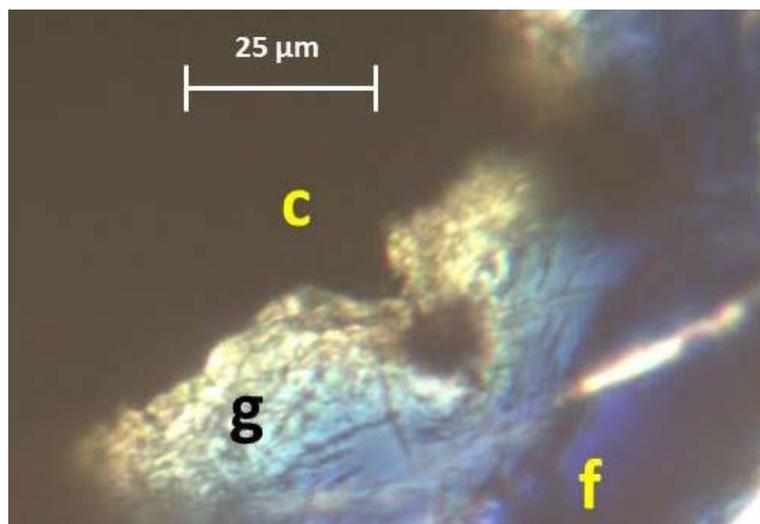


Figura 4.3.13 Detalle correspondiente a 1 mes con recubrimiento de MgF_2 .

En la Figura 4.3.14, referente a un implante también de un mes pero en estado de recepción, se aprecia que la degradación tiene un papel más activo. Las zonas de productos de corrosión (g) ocupan mayores volúmenes, cuyo resultado corrobora la tendencia observada en la Figura 4.3.8. La superficie del implante (c) comienza a mostrar el ataque característico de la corrosión por picaduras.

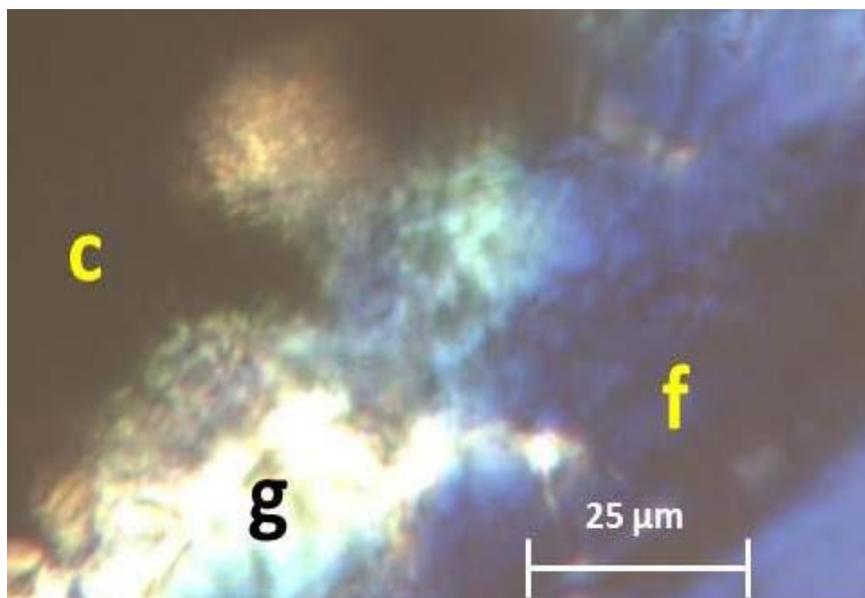


Figura 4.3.14 Detalle correspondiente a un implante de AZ31 sin recubrimiento de MgF₂ tras 1 mes de inserción.

El proceso de biodegradación se encuentra mucho más avanzado a los 9 meses, tal como se aprecia en la Figura 4.3.15, referente a un implante con recubrimiento de MgF₂. Las picaduras en el implante se hacen más evidentes. Los productos de corrosión se acumulan entre los entrantes.

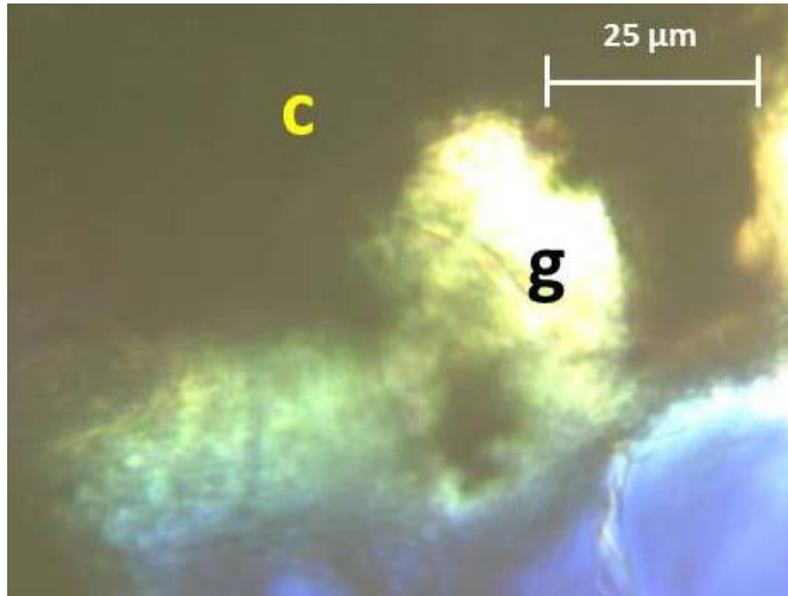


Figura 4.3.15 Detalle de un implante con recubrimiento de MgF_2 tras 9 meses

Pocas diferencias se pueden observar en implantes de AZ31 sin capa tras 9 meses. Tal vez, que la neoformación de hueso (masa azul) avanza algo más hacia el interior de las picaduras (Figura 4.3.16), las cuales tienen una profundidad ya considerable.

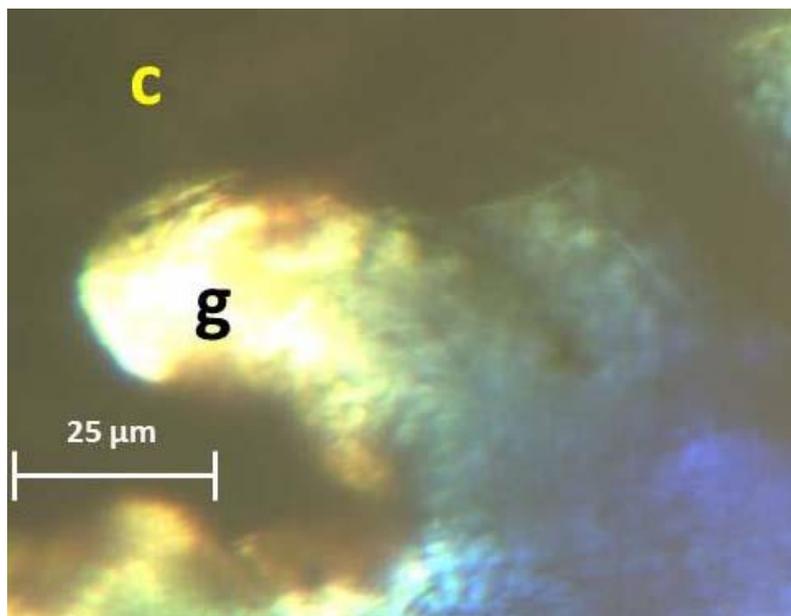


Figura 4.3.16 Detalle correspondiente a un implante sin recubrimiento de MgF_2 tras 9 meses.

En la Figura 4.3.17, correspondiente a un implante de AZ31 con recubrimiento de MgF_2 tras 13 meses de inserción, se aprecia con claridad que las picaduras aumentan en densidad y sobre todo en profundidad (g). Los productos de corrosión van difundiendo y alejándose de la superficie del implante.

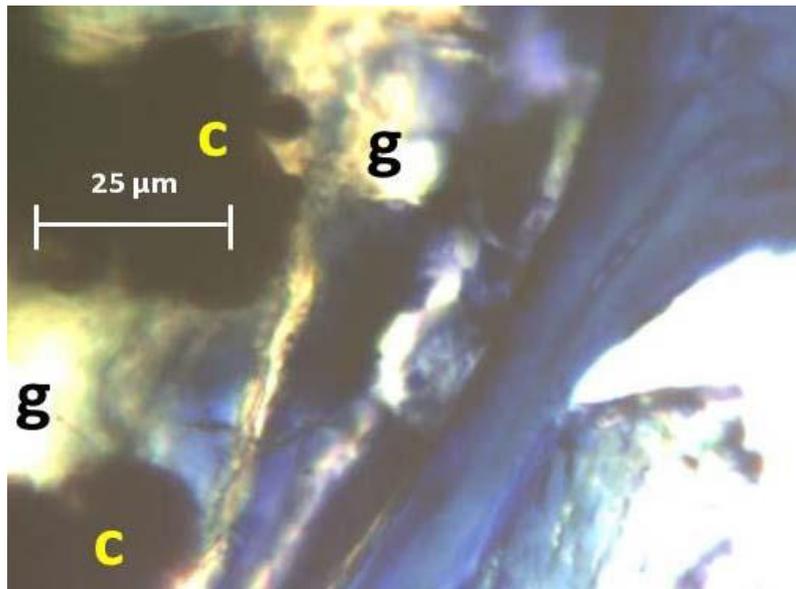


Figura 4.3.17 Detalle de un implante con recubrimiento de MgF_2 tras 13 meses.

También a 13 meses, pero sin recubrimiento de MgF_2 , (Figura 4.3.18)

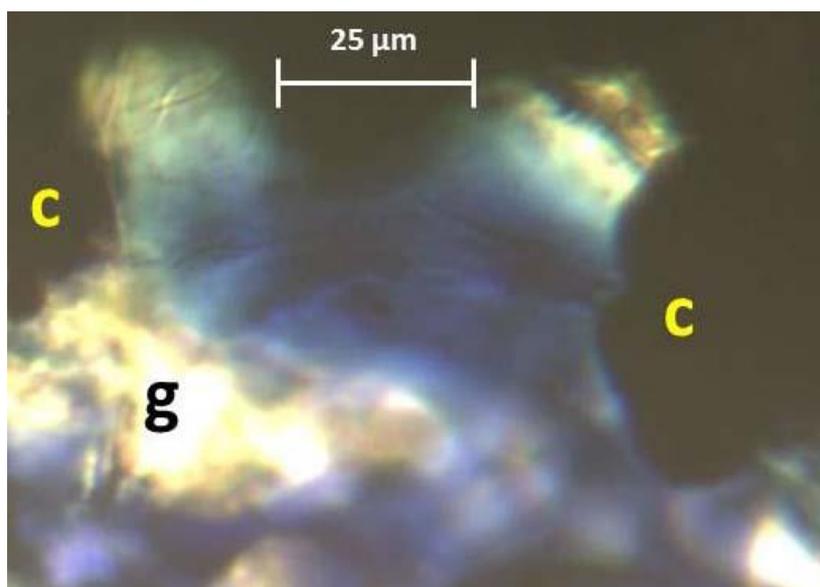


Figura 4.3.18 Detalle de un implante sin recubrimiento de MgF_2 tras 13 meses.

En ella puede apreciarse que, en ausencia del recubrimiento protector, los productos de corrosión también se van separando de los restos del implante y su espacio lo va ocupando tejido con capacidad osteogénica (en azul).

Estudio **cuantitativo** mediante histomorfometría:

En la Figura 4.3.19 puede observarse que los porcentajes de reabsorción para 1, 9 y 13 meses han sido respectivamente de 24,5 % \pm 5,0, 53,5 % \pm 16,8 y 59,7 % \pm 18,7. Estos datos han sido calculados a partir del conjunto de todas las condiciones de las ratas portadoras de implante. Un ejemplo de los cortes sobre los cuales se cuantificaron las respectivas áreas puede verse en la Figura 4.3.20. Téngase en cuenta que a mayor reabsorción (Figura 4.3.19) implica que permanece menor área del implante (Figura 4.3.20).

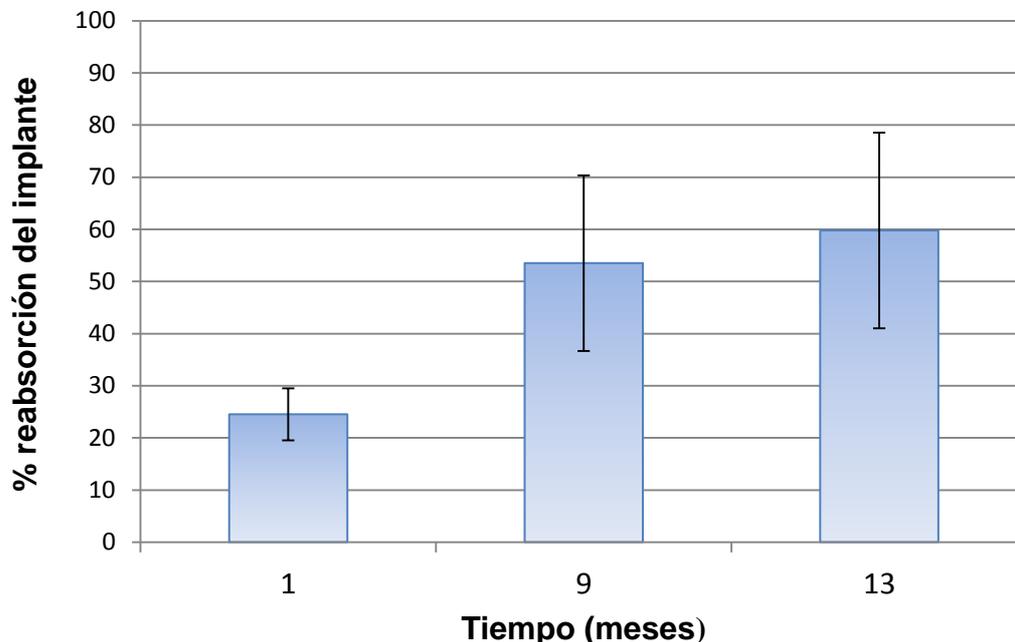


Figura 4.3.19 Porcentaje de reabsorción de los implantes de AZ31 con el tiempo.

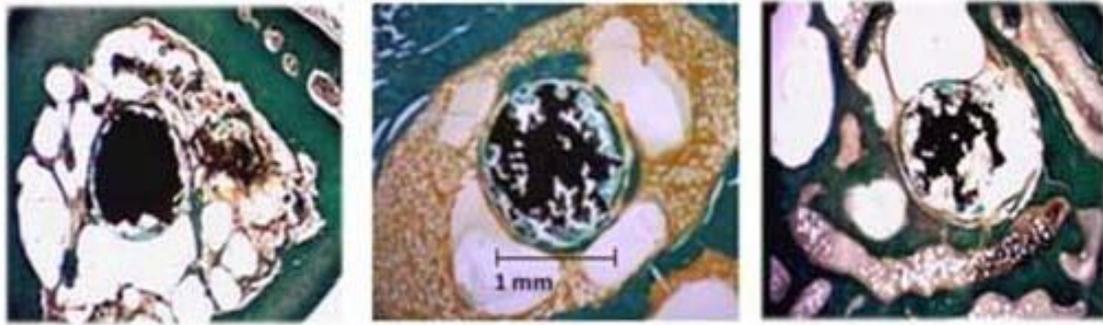


Figura 4.3.20 Análisis histológico de la evolución de los implantes de AZ31. Secciones transversales teñidas con tricrómico de Masson tras 1, 9 y 13 meses desde la inserción (de izqda. a dcha.). El área negra central es el implante y la verde del exterior, el hueso cortical.

Influencia de la fractura:

La influencia de la fractura sobre la tasa de reabsorción del implante puede visualizarse en la Tabla 4.3.1. Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre con y sin fractura, únicamente a los 13 meses, por cuanto el valor p de la ANOVA es $\leq 0,05$.

Tiempo (meses)	Fémures sin fractura		Fémures con fractura	
	Media	Desv. Std.	Media	Desv. Std.
1	21,58	3,44	27,43	3,38
9	51,76	4,22	55,27	5,54
13	53,51	4,06	66,07	4,17
ANOVA	$\rho > 0,05$ en 1 y en 9 meses. $\rho_{13 \text{ meses}} = 0,02$ Hay diferencias entre con y sin fractura			

Tabla 4.3.1 Datos estadísticos de porcentaje de reabsorción de los implantes de AZ31. Comparación de reabsorción de implantes entre fémures con y sin fractura.

Influencia del recubrimiento de MgF₂:

La influencia del recubrimiento de MgF₂ sobre la tasa de reabsorción del implante puede verse en la Tabla 4.3.2. Se observa que, curiosamente, hay una mayor reabsorción del implante a 9 meses en aquellos implantes que portan una capa exterior de MgF₂, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, por cuanto el valor de la ANOVA es $> 0,05$.

Tiempo (meses)	Implantes sin capa		Implantes con capa	
	Media	Desv. Std.	Media	Desv. Std.
1	28,52	5,00	20,49	4,89
9	51,12	4,42	55,94	7,82
13	58,67	8,65	60,88	9,71
ANOVA	$\rho > 0,05$ en los 3 meses. No hay diferencias a ningún tiempo entre con y sin capa			

Tabla 4.3.2 Datos estadísticos de porcentaje de reabsorción de los implantes de AZ31. Comparación entre implantes con y sin capa de MgF₂.

Para comprobar si los datos obtenidos mediante tomografía se correlacionan con los provenientes de los estudios histomorfométricos, se llevó a cabo una comparación a diferentes tiempos entre el porcentaje de reabsorción del implante (medido por histomorfometría) y el volumen de gas o el de implante más productos de corrosión generados (medidos por tomografía). Los resultados se pueden observar en las Figuras 4.3.21 y 4.3.22.

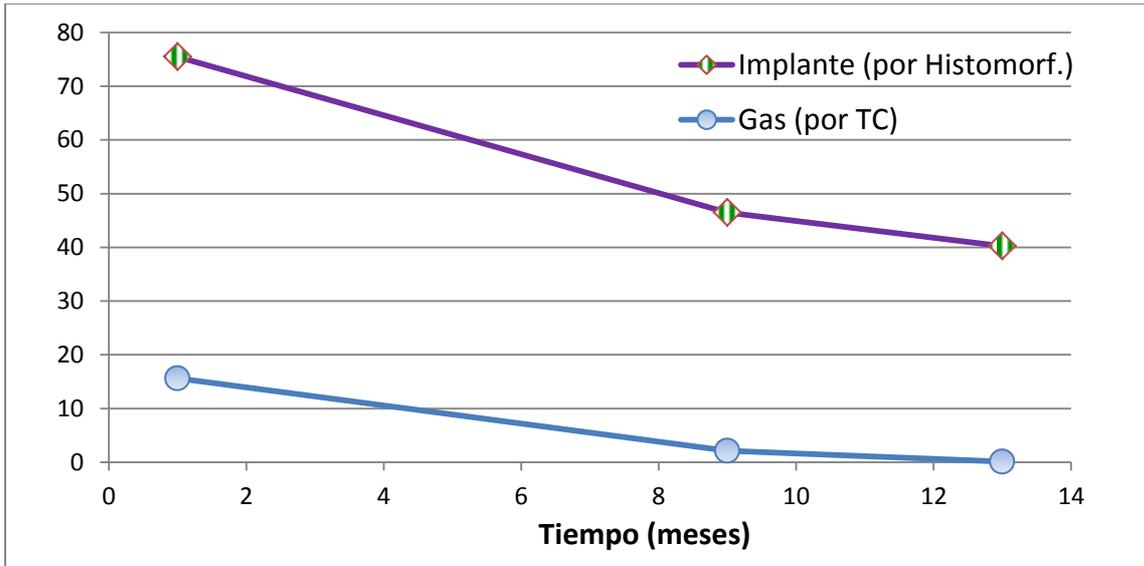


Figura 4.3.21 Comparación entre valores obtenidos a partir de medidas de tomografía y los provenientes de medidas de histomorfometría. Valores del implante remanente en % y de gas generado en mm³.

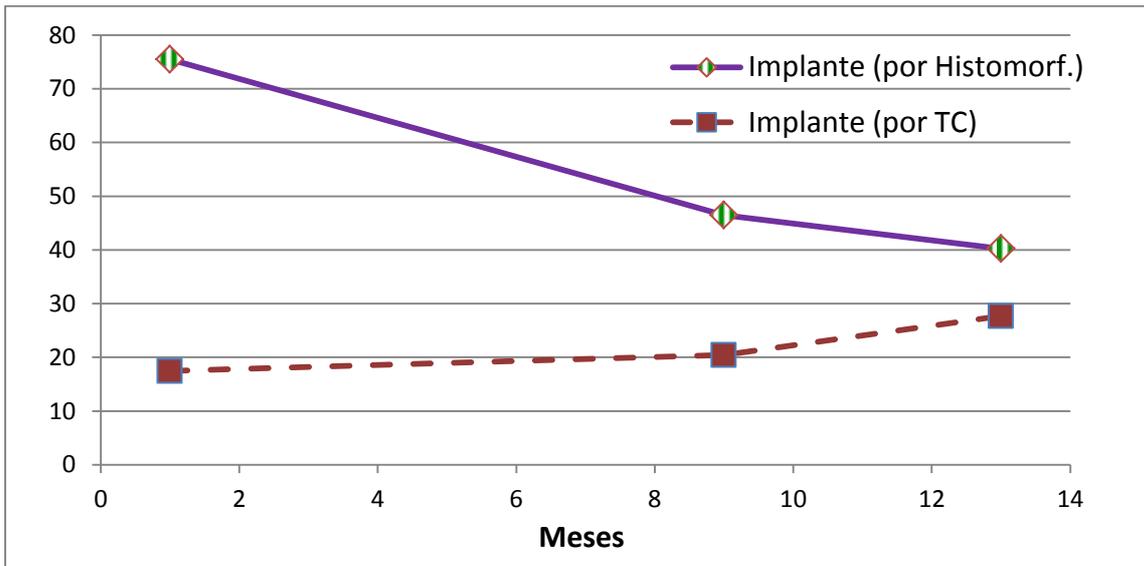


Figura 4.3.22 Comparación entre valores obtenidos a partir de medidas de tomografía y los provenientes de medidas de histomorfometría. Valores del implante remanente en % y de implante medido por TC en mm³.

Parece que puede existir una correlación entre el porcentaje del implante que permanece y el gas producido, pero no parece que se dé lo mismo entre las

dos formas de medir el volumen del implante. Para confirmarlo, se realizó un estudio estadístico de correlación entre las variables implicadas, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.3.3:

Tomografía	Histomorfometría	Volumen implante
Volumen gas	Correlación de Pearson	0,670*
	Significancia	0,000
	Tamaño muestral	36
Volumen implante	Correlación de Pearson	-0,038
	Significancia	0,782
	Tamaño muestral	36

Tabla 4.3.3 Correlación entre valores obtenidos a partir de medidas de tomografía y los provenientes de medidas de histomorfometría.

Los resultados de correlación de Pearson pueden oscilar entre 1 y -1, valores que representan la máxima correlación posible entre dos variables (según se trate de una relación directa o inversa, respectivamente). El valor 0 indicaría que no existe la más mínima relación entre ellas.

Como se puede comprobar, el análisis estadístico efectuado mediante el programa SPSS confirma que existe una correlación significativa ($p = 0,000$) entre el volumen de gas generado y el porcentaje de implante que permanece.

4.4 EFECTOS SISTÉMICOS DE LA CORROSIÓN DEL IMPLANTE

La influencia del factor tiempo en la acumulación de trazas metálicas en los órganos, derivada de la biodegradación de la aleación AZ31, queda resumida en la Tabla 4.4.1. Los datos muestran un incremento en los contenidos de Mg, Al y

Mn con el tiempo, mientras que los correspondientes al Zn se mantienen estables.

	1 mes		9 meses		13 meses	
	Media	Desv. Std.	Media	Desv. Std.	Media	Desv. Std.
Mg	570,03	86,36	622,04	153,65	641,08	115,32
Al		0,51	2,60 ^{a,c}	0,74	4,64 ^{b,c}	1,28
Mn	2,22	1,63	2,34	1,91	2,62	2,00
Zn	63,50	13,78	65,60	14,59	65,37	10,38

Datos en ppm. a,b,c=Diferencias significativas al 95%

Tabla 4.4.1 Contenido de los elementos de la aleación AZ31 en órganos de ratas sacrificadas a diversos tiempos de implantación.

De todos los elementos estudiados, únicamente el Al muestra diferencias significativas para todos los tiempos. Para descartar la posibilidad de que este incremento de trazas con el tiempo reflejado en la Tabla 4.4.1 se debiera a otros factores ajenos a la inserción del implante, se procedió a comparar ratas control y ratas portadoras de implante a los 13 meses de evolución. Los resultados obtenidos se ofrecen en la Tabla 4.4.2.

	Sin implante		Con implante		ANOVA
	Media	Desv. Std.	Media	Desv. Std.	p
Mg	563,60	111,72	641,08	115,32	0,242
Al	0,81	0,75	4,64	2,98	0,024*
Mn	2,13	1,98	2,62	2,00	0,682
Zn	64,41	11,28	65,37	10,38	0,808

Datos en ppm (peso seco).. * =Diferencias significativas al 95%

Tabla 4.4.2 Contenido de elementos metálicos en ratas con y sin implante, sacrificadas a los 13 meses después de la cirugía. ANOVAs para las comparaciones entre pares con/sin implante para cada elemento.

Una vez más es el Al el único elemento que muestra diferencias significativas. Teniendo en cuenta los posibles problemas de toxicidad relacionados con este elemento y su incremento significativo, se realizó un estudio exhaustivo de la acumulación del Al en los diferentes órganos.

Como puede apreciarse en la Figura 4.4.1, el contenido en Al aumenta en todos los órganos estudiados:

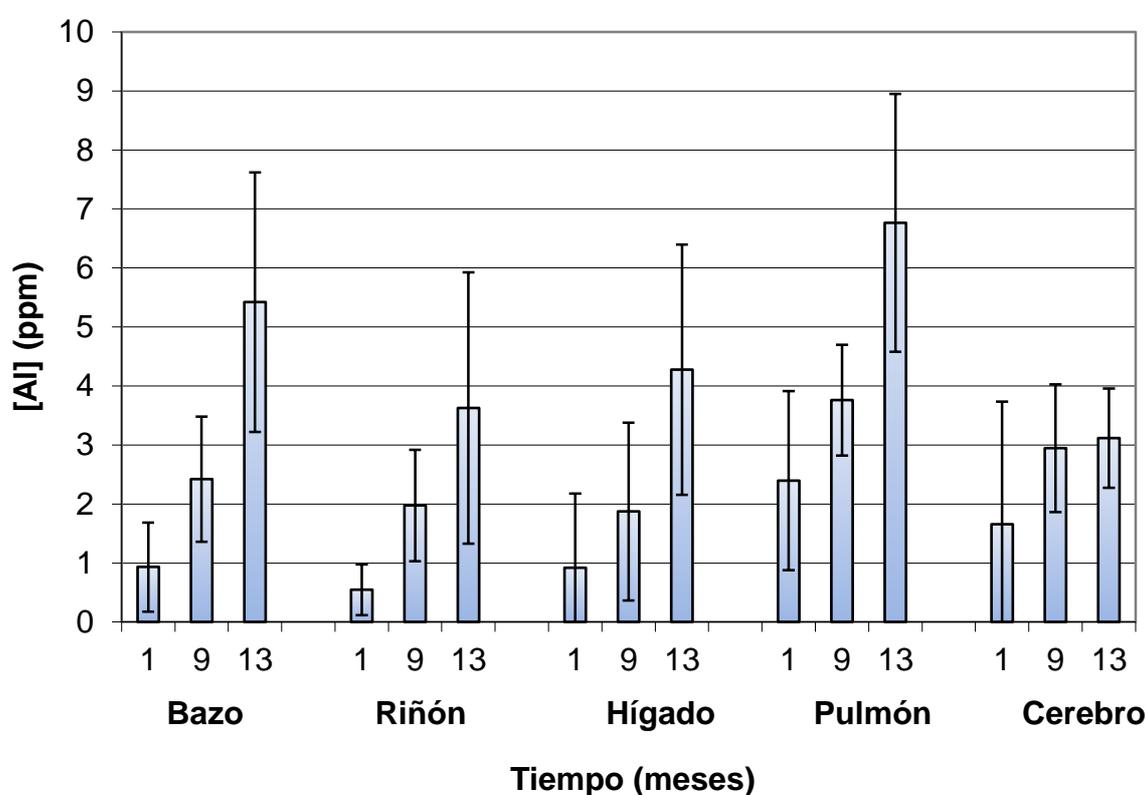


Figura 4.4.1 Contenido en Al en órganos de ratas sacrificadas tras diferentes tiempos de implantación. Datos en ppm. Las barras de error representan la desviación estándar (D.S.).

El análisis estadístico reflejado en la Tabla 4.4.3 confirma este aumento. La única excepción es el cerebro, donde no se encuentran diferencias significativas (ANOVA > 0,05) tras 13 meses desde la inserción del implante.

	ANOVA
Bazo	0.002*
Riñón	0.031*
Hígado	0.008*
Pulmón	0.014*
Cerebro	0.086

* =Diferencias significativas al 95%

Tabla 4.4.3 Valores de ANOVA para contenido de Al correspondientes a las comparaciones entre 0 y 13 meses para diferentes órganos de ratas portadoras de implante. (* = Diferencias significativas al 95% de confianza). El cerebro es el único órgano en el que no hay diferencias entre 0 y 13 meses.

La Tabla 4.4.4 muestra el contenido de Al para ratas con y sin implante. En esta ocasión los datos han sido segregados en función del órgano de procedencia.

	Sin Implante	Con Implante	ANOVA	Δ Al (ppm)	Órgano (mg)	Δ Al (mg)	% Al del implante recuperado
	Media \pm DS	Media \pm DS	<i>p</i>	[a]	[b]	[c]	[d]
Bazo	0,44 \pm 0,35	5,42 \pm 4,98	0,012*	4,98	353 \pm 16	1,76E-03	0,31
Riñón	0,41 \pm 0,48	3,62 \pm 3,21	0,028*	3,21	671 \pm 15	2,15E-03	0,38
Hígado	0,46 \pm 0,39	4,27 \pm 3,81	0,017*	3,81	4114 \pm 93	15,67E-03	2,77
Pulmón	1,50 \pm 1,76	6,76 \pm 5,26	0,031*	5,26	410 \pm 38	2,16E-03	0,38
Cerebro	1,22 \pm 1,12	3,11 \pm 1,90	0,331	1,90	321 \pm 66	6,10E-04	0,11
Σ órganos						22,35E-03	3,95

Datos en ppm (peso seco). * = diferencias significativas al 95% de confianza

Tabla 4.4.4 Contenido en Al de los órganos de ratas control y ratas con implante tras 13 meses desde su inserción: [a] incremento medio, diferencia entre con y sin implante, [b] peso medio seco de los órganos, [c] incremento de Al (en mg), calculado como [a] x [b], [d] porcentaje de la masa original de Al del implante que ha sido recuperada en cada órgano.

Para cuantificar el porcentaje de aluminio recuperado en cada órgano, se procedió al siguiente cálculo: el peso medio del implante es de 28 mg, del cual el 3,37% corresponde a Al, lo que equivale a 0,94 mg de aluminio en el implante completo. Considerando que a los 13 meses la biodegradación del implante es de un 60%, el aluminio liberado es de 0,57 mg. Si consideramos el incremento de Al ([a]) normalizando el peso por órgano ([b]), obtenemos el incremento de Al en mg ([c], calculado como $[a] \times [b]$). La última columna corresponde por tanto al porcentaje del Al total del implante recuperado en cada órgano ([d]).

Influencia de la fractura

La Tabla 4.4.5 muestra los resultados de las ANOVAs de comparaciones entre ratas con y sin fractura para cada elemento metálico y órgano estudiados. Puesto que todos los valores son superiores a 0,05, no se encuentran diferencias significativas (al 95% de confianza) que puedan ser atribuidas al factor fractura.

	Bazo	Cerebro	Hígado	Pulmones	Riñones
Mg	0,696	0,641	0,602	0,996	0,138
Al	0,103	0,121	0,651	0,188	0,091
Mn	0,667	0,405	0,864	0,067	0,302
Zn	0,959	0,492	0,459	0,260	0,083
F	0,815	0,539	0,746	0,581	0,208

Tabla 4.4.5 Valores de ANOVAs de los pares de comparaciones elemento – órgano, entre ratas con y sin fractura. No se encuentra ninguna diferencia significativa, puesto que todos los resultados son $> 0,05$).

Influencia del recubrimiento de MgF_2 :

Con respecto a la última variable analizada, la influencia de un tratamiento previo del implante en HF, se estudió en primer lugar si al tiempo máximo de permanencia de los implantes (13 meses), existían indicios de acúmulo de F en los órganos. La Figura 4.4.2 muestra los resultados obtenidos:

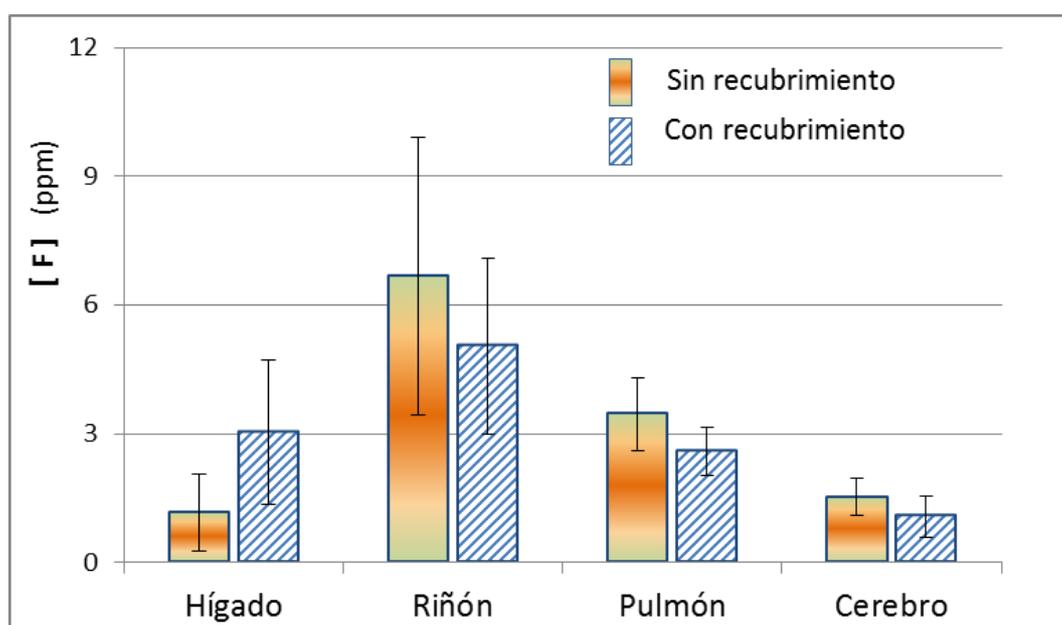


Figura 4.4.2 Contenido de F en órganos de ratas sacrificadas a 13 meses. Comparativa entre las que llevan implantes con y sin recubrimiento de MgF_2 .

Puede comprobarse que no hay un aumento estadísticamente significativo de F en órganos asociado a los implantes con recubrimiento de MgF_2 .

Por otro lado se evaluó el posible efecto protector de dicho recubrimiento sobre la liberación de otros elementos del implante (y su acumulación en los órganos). La Tabla 4.4.6 indica que no se advierte ningún efecto significativo del recubrimiento de MgF_2 .

	ANOVA 13 meses
Mg	0,512
Al	0,667
Mn	0,794
Zn	0,371
F	0,671

* =Diferencias significativas al 95%

Tabla 4.4.6 Valores de ANOVAs de las comparaciones entre ratas con y sin capa de MgF_2 sacrificadas tras 13 meses de la inserción del implante. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los elementos, puesto que todos los resultados son $> 0,05$.

5 DISCUSIÓN

5.1 CARACTERIZACIÓN Y BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS MATERIALES DE BASE MAGNESIO

En los últimos tiempos, el campo de los biomateriales en aplicaciones ortopédicas ha visto notablemente impulsada la investigación en materiales biodegradables para implantes temporales, con el objetivo de ayudar a restablecer la función locomotora ósea en el menor tiempo posible y sin dejar rastro, a largo plazo, del material implantado. Es, en esta aplicación, en la que ha irrumpido con fuerza el magnesio y sus aleaciones, como materiales reabsorbibles y biodegradables. Los materiales biodegradables deben presentar una cinética de degradación en el organismo lo suficientemente lenta como para mantener sus propiedades mecánicas el tiempo necesario para permitir que el tejido dañado haya sido reparado. Es por ello que en el presente trabajo se han estudiado las propiedades mecánicas y el comportamiento frente a la corrosión en medio fisiológico y en cultivo celular, de materiales de base magnesio, tanto puro (pulvimetalúrgico y colado) como en aleación (AZ31). Además, con objeto de mejorar el comportamiento a la corrosión de estos materiales, en este trabajo se ha propuesto su protección superficial mediante un sencillo tratamiento de conversión química en ácido fluorhídrico, evaluando comparativamente el comportamiento de los materiales en estado de recepción y modificados superficialmente.

Respecto a las propiedades mecánicas de los distintos materiales de base Mg, sólo el Mg PM y la aleación AZ31 poseen un límite elástico superior al del hueso (Figura 4.1.3), lo que les hace adecuados para fijar fracturas de huesos que soportan carga, mientras excluye para este tipo de aplicaciones, al Mg

procesado mediante colada. Las adecuadas propiedades mecánicas del Mg pulvimetalúrgico y de la aleación AZ31 (Figura 4.1.3), es debida al menor tamaño de grano de su microestructura, en comparación con el magnesio procesado por colada, de $5\mu\text{m}$, $25\mu\text{m}$ y del orden de mm, respectivamente (Figuras 4.1.1 y 4.1.2).

El comportamiento comparativo de estos materiales en estado de recepción mostró que la menor reactividad química (mayores valores de potencial), venía dada por la superficie de la aleación AZ31 (Figura 4.1.8 c)). Al ser ensayados estos materiales en un medio corrosivo como el DMEM, las mayores resistencias de transferencia y por tanto las menores velocidades de corrosión también fueron mostradas por la aleación AZ31 (Figura 4.1.11 c) junto al Mg procesado por colada. Así pues, realizando un compendio de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, la aleación AZ31 fue el material que presentó mejores propiedades mecánicas, muy similares a las del hueso y mostró la mayor resistencia a la corrosión. No obstante, siguió presentando velocidades de corrosión elevadas. El tratamiento de conversión química en HF, generó un recubrimiento de MgF_2 compacto y adherente, de baja reactividad y con potenciales más altos (de alrededor de 800 mV), que los hallados en la AZ31 sin capa (de unos 350mV), que ennoblecó la superficie en todos los materiales en estudio (Figura 4.1.8 d), e) y f)). Dicho tratamiento redujo la velocidad de corrosión en al menos un orden de magnitud con respecto a los materiales sin el recubrimiento (Figura 4.1.11 a'), b') y c')). En los estudios en inmersión en medios fisiológicos, este recubrimiento se ha mostrado capaz de mantener al Mg del implante aislado del medio durante periodos más largos,

disminuyendo con ello la cinética del proceso de corrosión, de acuerdo con otros resultados que aparecen en la literatura [78, 79, 98-100].

Teniendo en cuenta todos los resultados enumerados hasta este punto, se decidió pasar a la fase de ensayos en cultivo celular únicamente con la aleación AZ31 con recubrimiento de MgF_2 , que fue el material de mejores propiedades mecánicas y mayor resistencia frente a la corrosión, incrementada con el recubrimiento de fluoruro.

En cultivo celular con líneas propias del tejido óseo (pre-osteoblastos MC3T3-E1) y de referencia en estudios de biocompatibilidad (fibroblastos L929), el material de AZ31 con un recubrimiento de MgF_2 ha ofrecido buenos resultados desde el punto de vista de la biocompatibilidad, lo que queda sustentado por la proliferación de ambas líneas celulares tras 7 días de cultivo (Figura 4.2.2) y porque la viabilidad de las células crecidas sobre probetas de AZ31 ha sido equiparable a la de los controles crecidas en placas sin la AZ31 (Figura 4.2.4).

5.2 BIOCORROSIÓN *IN VIVO* DE LA ALEACIÓN AZ31.

La aleación AZ31, seleccionada en los ensayos previos, para su posible aplicación en forma de implante temporal debe de ser biocompatible, mantener sus propiedades mecánicas el tiempo suficiente para permitir la reparación de la osteosíntesis y al mismo tiempo biodegradarse hasta su desaparición, tanto en estado de recepción como con recubrimiento de fluoruro, sin causar efectos perjudiciales ni a nivel local ni sistémico y sin requerir de una nueva intervención quirúrgica para extraer el material temporal.

Para ello la tasa de degradación del material debe mantener un equilibrio entre las necesidades de permanencia, con adecuadas propiedades mecánicas de sostén para el sanado de la fractura y su posterior biodegradación y reabsorción.

El proceso de biodegradación de los materiales temporales basados en el Mg, cuando son insertados in vivo, presenta dos problemas fundamentales en la práctica clínica: por un lado la rápida biocorrosión del material [101-103], que provoca pérdida de sus propiedades mecánicas y por el otro la excesiva formación de gas, que puede afectar a la reparación de la fractura [104-106].

Los siguientes apartados pretenden mostrar la biocompatibilidad y si en ensayos in vivo la aleación AZ31 presenta propiedades mecánicas durante el tiempo suficiente como para permitir la reparación de fracturas. También abordará el proceso de biodegradación y qué efectos locales y sistémicos puede dar lugar.

5.2.1 Estudio de los efectos locales de la biocorrosión del implante de AZ31

La respuesta local del organismo observada en los estudios histológicos correspondientes al primer mes desde la inserción del implante, permiten afirmar que no se ha observado ni reacción a cuerpo extraño ni reacción inflamatoria (Figura 4.3.11 a)). Tampoco se ha producido osteolisis o reabsorción ósea como consecuencia de la inserción del material en la cavidad intramedular.

A este tiempo de 1 mes de evolución, ya aparece una delgada capa fibrosa que rodea al implante, formando un anillo (Figura 4.3.12 a)). Este proceso ha

dado paso a los 9 meses a trabéculas de tejido óseo (Figura 4.3.11 b)), que a los 13 meses se han convertido en una capa de tejido óseo maduro que rodea al implante por completo (Figura 4.3.11 c)). Este hueso recién generado se encuentra adherido a la superficie del implante, lo que es un indicador directo de la buena biocompatibilidad y la capacidad osteoinductiva del mismo. Estos resultados están de acuerdo con lo obtenido por otros autores [107-111].

En aquellos animales que presentaban fractura, se constató que el callo de fractura se formó entre el tercer y el cuarto mes y se consideró completamente consolidada la fractura al quinto mes (Figura 4.3.4), no observándose ninguna evidencia de pseudoartrosis.

La consolidación ósea del callo fracturado se produjo en el 100% de los animales estudiados.

En las imágenes de 9 y 13 meses ya no hay diferencias apreciables entre ratas con fractura y sin ella (Figuras 4.3.3 y 4.3.4), lo que demuestra que hay una restitución ósea completa, de tal forma que los fémures fracturados a 9 y 13 meses de evolución presenten una morfología similar a la de los no fracturados.

El equilibrio que se busca entre la consolidación ósea y la biodegradación del implante parece conseguirse adecuadamente para la aleación de magnesio AZ31 en este estudio con ratas. No obstante cuantificando el proceso de biodegradación a través de los estudios histomorfométricos se llegó a concluir que al mes el material reabsorbido era del 24,5 % (Figura 4.3.19). La biocorrosión no altera la estructura central del implante, progresando la corrosión por picaduras desde su superficie hacia el interior. A los 9 meses, llevando ya consolidadas las fracturas 4 meses, la cantidad de implante reabsorbido es de un 53,5 %, lo que hace que este material pueda ser considerado para su empleo en

osteosíntesis. Los implantes que han sido modificados mediante el tratamiento de conversión química en HF, e insertados en los animales experimentales, mostraron que no existían diferencias histológicas en la reacción producida entre el material implantado que lleva recubrimiento superficial de MgF_2 y el que carece de ella, mostrando la buena biocompatibilidad de la capa, coincidiendo con lo ya observado en los ensayos en cultivos celulares. De hecho, durante los primeros 4 meses de inserción, el volumen del implante se mantiene constante, confirmando la mayor estabilidad frente a la corrosión de los implantes recubiertos frente a los no recubiertos (Figura 4.3.9 y Figura 4.3.10). A partir del 4 mes, justo cuando comienza a formarse el callo de fractura, la evolución de corrosión es incluso mayor en los materiales recubiertos, por lo que parece cumplir el objetivo inicialmente propuesto en esta memoria, que el implante se degrade rápidamente una vez consolidado en callo de fractura.

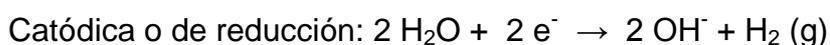
A los 13 meses de evolución se observó cómo el proceso de biodegradación de los implantes de AZ31 no había finalizado, encontrándose valores de reabsorción del material en torno al 60 %. En este estudio pues sólo se ha podido establecer la cinética de la biodegradación del implante hasta un máximo de 13 meses de evolución.

Como se ha comentado anteriormente, la cinética de biocorrosión de la AZ31 in vivo comienza por picaduras en los bordes del material y progresa hacia el interior (Figura 4.3.11 a). En las imágenes a mayor aumento se observa la morfología de las picaduras en el implante (Figuras 4.3.13 y 4.3.14) y cómo se depositan los materiales de la biodegradación alrededor del mismo, entre el material y el tejido óseo neoformado (Figuras 4.3.15 y 4.3.16). Las imágenes corroboran también que en el mes 13 el ataque por picaduras afecta gravemente

a la parte central del implante, cuando el material muestra ya una biodegradación muy avanzada (Figura 4.3.11 c).

La biodegradación de la AZ31 es por lo tanto bastante homogénea *in vivo* durante todo el tiempo de ensayo en contraposición con lo encontrado en otros trabajos [107, 112].

La reacción de corrosión *in vivo* sucede según dos semirreacciones:



La primera semirreacción comienza en la superficie del implante, tanto en los implantes sin modificar, como en los modificados superficialmente (más lentamente en este último caso, a través de las grietas presentes en el recubrimiento, visibles en la Figura 4.1.7), desde el primer momento de su inserción, debido a que dichos implantes están bañados por fluido fisiológico (compuesto básicamente por agua y sales minerales donde el cloruro sódico es el componente inorgánico mayoritario). Como consecuencia de la corrosión del material, se produce así la formación de óxido e hidróxido de Mg (seguida de una formación posterior de fosfatos y carbonatos de Mg). Estos productos de corrosión se depositan sobre la superficie del implante, como ha sido ya descrito en ensayos *in vitro* e *in vivo* [101, 102], formando una capa parcial y temporalmente protectora, y aislando al implante de los fluidos corrosivos. No obstante, si la concentración de iones cloruro en el medio alcanza una concentración de 30 mM (los valores considerados fisiológicos oscilan entre 95 y 110 mM), los hidróxidos se transforman a cloruro de magnesio, que es altamente soluble [111]. Ello propicia el avance de la biocorrosión por picaduras (Figura 4.3.13 y 4.3.14) sobre la superficie del implante. Si esta elevación en el nivel de

cloruros no se produce, estos óxidos e hidróxidos de Mg promueven la acumulación de fosfato cálcico y por tanto la formación de nuevo hueso alrededor del implante [103, 113]. Esta acumulación de productos sobre la superficie del implante hace que, mediante imágenes de tomografía, sea difícil distinguir la superficie del implante degradado de la de los productos de corrosión que le acompañan. Esta es la razón por la cual al irse degradando el implante, en las tomografías parece que su área aumenta en vez de disminuir, pues se miden de forma inseparable el implante remanente sumado a los productos de degradación depositados sobre él (Figuras 4.3.5 y 4.3.6).

Si hay reacción anódica o de biocorrosión (donde el Mg pasa de valencia 0 a valencia 2) con pérdida de dos electrones, tiene que haber una reacción de reducción o captación de dichos electrones; en esta otra semirreacción hay una combinación de protones con los electrones captados, liberando gas hidrógeno (por cada mol de Mg disuelto, se produce un mol de H_2). Basándonos en esta estequiometría, se procedió a cuantificar mediante tomografía el proceso de biocorrosión midiendo la reacción catódica o de reducción, es decir la formación de gas. Dependiendo de la cantidad de gas que se produce y su velocidad de formación, el organismo es capaz de absorberlo e intercambiarlo con otros gases por difusión [113] o bien su exceso se acumula formando paquetes o bolsas de gas, que se visualizan como espacios oscuros en las imágenes de tomografía y que son muy evidentes en el primer mes (Figuras 4.3.2, 4.3.3. y 4.3.4). El gas se acumula en los extremos del implante, correspondientes a las metáfisis del hueso, dado que es donde mayor vascularización hay, y en los bordes de la fractura debido a que tiene mayor aporte de medio fisiológico.

En el grupo de animales sin fractura, los productos de corrosión procedentes

del proceso de biodegradación quedan depositados sobre la superficie del implante, protegiéndola en cierta medida del proceso de corrosión. Sin embargo estos depósitos de productos de corrosión crecen, se hacen más voluminosos y se vuelven porosos: el oxígeno y el agua del medio que rodea al implante tienen entonces nuevamente acceso a la superficie del implante, de forma que se reactiva el proceso de biodegradación, causante de que reaparezca el gas en las metáfisis en las ratas sin fractura en torno a los 10 meses (Figura 4.3.7). Este incremento no sucede en las ratas con fractura (Figura 4.3.7), porque ésta actúa como vía de intercambio de gases y no favorece su acumulación.

La comparación entre dos vías de medir el mismo proceso (tomografía e histomorfometría) ofrece una razonable correlación (Figura 4.3.21) y (Tabla 4.3.3) entre la biocorrosión del implante (por histomorfometría) y la consiguiente formación de gas (por TC), aunque siempre asumiendo que el volumen de gas medido nos ofrece valores por defecto, ya que una fracción de ese gas generado es reabsorbido por los tejidos y excretado, no reflejándose en la imágenes. Sin embargo, no se ha establecido correlación si tratamos de estimar el volumen del implante mediante histomorfometría y a través de las imágenes tomográficas (Figura 4.3.22) y (Tabla 4.3.3), debido a la distorsión que generan los productos de corrosión adheridos en mayor o menor grado y que la TC no es capaz de distinguir del implante en sí. La implicación práctica de esta correlación apunta a la posibilidad de llevar un seguimiento de la biodegradación de implante midiendo la formación de gas mediante una técnica no invasiva como es la tomografía.

El recubrimiento de MgF_2 que en los estudios *in vitro* demostró tener una alta eficacia en la reducción de la tasa de corrosión del AZ31 [71, 78, 114], no ha frenado la corrosión del implante en nuestro estudio, al menos desde un punto de

vista estadísticamente significativo. Si bien la biodegradación inicial a tiempos cortos (1 mes) es menor en los implantes con recubrimiento, lo que ayuda inicialmente a consolidar la fractura, a los 9 y 13 meses la degradación es mayor en el caso de los implantes que tenían recubrimiento de fluoruro, aunque de manera estadísticamente no significativa (Tabla 4.3.2) Este comportamiento se aproxima al esperado en un biomaterial temporal ideal, que sea reabsorbido por el organismo cuando ha finalizado de realizar su función. Existe concordancia entre estos resultados y los estudios de Thomann [107], que encuentra que a los 6 meses el volumen de los implantes con capa de MgF_2 es un 13% mayor que el de los que no portan recubrimiento. Aunque en general el recubrimiento protector es en un principio compacto y uniforme, aparecen defectos como poros y grietas (Figura 4.1.7). A través de estos defectos los fluidos fisiológicos penetran y pueden actuar como núcleos para el ataque de corrosión. Gu [101] describe este mecanismo para la AZ31 *in vitro*. De acuerdo con Wang [115], la corrosión se acelera si el recubrimiento es destruido puntualmente. En nuestros estudios, la diferencia de potencial que se establece entre zonas protegidas con recubrimiento (800 mV) y las zonas sin él (380 mV) (Figura 4.1.8) da lugar a la formación de pilas de corrosión galvánica que aceleran el proceso de biocorrosión. El incremento de pH asociado, que puede llegar localmente a valores de 9, contribuye a desestabilizar la capa de MgF_2 .

A diferencia del comportamiento encontrado en los experimentos *in vitro*, los resultados obtenidos *in vivo* (a tiempos mucho más largos) no siguen la misma tendencia, dado que *in vivo* existen muchos factores fisiológicos que no somos capaces de reproducir en los estudios *in vitro* [104]. Entre ellos, variables como el comportamiento electroquímico de las proteínas, los procesos de difusión o de

alteración muy localizada del pH, etc. Un parámetro que ha sido poco estudiado es el espesor de electrolito que baña el implante. Montoya [116] a través de un modelo matemático propuesto a partir de la transformada de Laplace, ha sido capaz de estudiar con un mayor grado de comprensión la corrosión *in vivo* de varillas intramedulares insertadas en fémures de rata en las dos condiciones consideradas en este estudio (con y sin fractura). Este autor llega a la conclusión de que el espesor del electrolito que baña el implante es una variable fundamental en la biocorrosión *in vivo*. La validación del modelo con implantes de AZ31 muestra que hay un espesor crítico de electrolito que condiciona el proceso de biodegradación de los implantes de la aleación de AZ31 en experimentación *in vivo*.

5.2.2 Estudio de los efectos sistémicos de la biocorrosión del implante de AZ31

Tanto por sus propiedades mecánicas como por su comportamiento a corrosión y su capacidad para biodegradarse de forma progresiva, la aleación AZ31 parece ser un material temporal adecuado para la osteosíntesis de fracturas óseas. Sin embargo, este proceso de biodegradación, un 60% en 13 meses (Fig. 4.3.19), puede provocar, además de la aparición de compuestos de magnesio, en forma de productos de corrosión, la liberación de los otros elementos de la aleación AZ31, como son el Al y el Zn. Todas estas trazas metálicas pueden pasar al torrente sanguíneo y emigrar a distintos órganos distantes y alejados de la localización del implante. Dependiendo de la naturaleza de la traza metálica y de su concentración se pueden producir efectos tóxicos en el organismo. En este apartado se ha pretendido conocer en qué órganos y en qué cantidad se localizan

los elementos metálicos que constituyen la aleación AZ31 y si se han alcanzado niveles que supongan riesgo de toxicidad.

El investigador Yuen [117] estableció para varias aleaciones, entre las que se encuentra la AZ31, el peso máximo teórico anual de implante asumible para que no provoque la aparición de efectos adversos, conocido como “no-observed-adverse-effect levels” (NOAEL). Este autor basó su estudio en una aleación AZ31B con una composición de 3,5% Al, 1,4% Zn y 1% Mn. La aleación AZ31 empleada en este trabajo tiene una composición ligeramente diferente: 3,37% Al, 0,78% Zn y 0,22% Mn.

Siguiendo los límites indicados por este autor, se ha analizado la toxicidad de los elementos de la AZ31 partiendo del de menor contenido en la aleación, en nuestro caso Mn, hasta el elemento más cuestionado o peligroso para el organismo, el Al.

El Mn está considerado como uno de los metales menos tóxicos cuando accede al cuerpo por vía oral [118, 119], pero resulta bastante tóxico cuando es administrado por vía respiratoria [120]. Trabajadores sometidos a atmósferas con concentraciones extremas, del orden de 27 mg m^{-3} [121] (más de 400 veces los niveles ambientales normales) [122], han desarrollado neurotoxicidad (locura mangánica) con temblores similares a los del Parkinson [120, 123]. El Mn es excretado vía heces tras ser almacenado en la bilis por el hígado, por lo que debe extremarse la precaución en pacientes con la función hepática alterada.

La dosis máxima tolerable de Mn ha sido establecida por Yuen en $7 \cdot 10^{-3} \text{ mg d}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$ de peso corporal. Considerando el contenido real de Mn en nuestro material (0,22 %), el límite teórico admisible sería de 232 mg año^{-1} . Este valor equivale a unas 8,3 veces el peso de nuestro implante, suponiendo que el 100 %

del implante se hubiera degradado al cabo del año. Sin embargo, teniendo en cuenta que a los 13 meses sólo se ha degradado el 60% del implante, el límite de seguridad subiría hasta 13,8 veces el peso de nuestro implante.

El segundo elemento a estudiar ha sido el Zn, que es un elemento considerado esencial para el organismo, por lo que habitualmente los problemas proceden de su carencia. Solamente la inhalación de atmósferas con concentraciones muy elevadas de Zn producen enfermedades tales como la fiebre reversible del Zn [124]. Yu, a pesar de emplear aleaciones con 6% de este metal (más de 7 veces superior al contenido en nuestra aleación AZ31), lo califica de no tóxico, más bien al contrario, capaz de estimular la formación de hueso [125].

Según Yuen, la dosis máxima tolerable de Zn ha sido establecida de forma teórica en $5,53 \cdot 10^{-2} \text{ mg d}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$ de peso corporal. Como nuestro implante tiene un contenido en Zn del 0,78%, el límite teórico sería de 517 mg año^{-1} , unas 18,5 veces el peso del material del implante insertado en este estudio (para un 100% de degradación); 30,8 veces el peso del implante para un 60% de corrosión en un año.

En cuanto al Mg, aunque se han citado efectos tóxicos [126, 127] o incluso mortales [128, 129] cuando ha sido administrado a muy altas dosis, incrementos moderados de su concentración no causan toxicidad ni en cultivos celulares [10, 79, 80, 130, 131] ni en el cuerpo humano [67-69]. En otros estudios, las aleaciones de magnesio implantadas in vivo promueven el crecimiento óseo en sus inmediaciones [132-134].

Estudios sobre toxicidad a corto plazo del Mg administrado por vía intravenosa han establecido que la dosis letal para el 50% de las ratas (LD50), es de 174 mg kg^{-1} de peso corporal en hembras y de 206 mg kg^{-1} de peso corporal en machos [127]. Para una rata de 200 g, eso supone entre 35-40 mg de Mg en una única dosis. Nuestro implante en su totalidad tiene unos 27 mg de Mg y al cabo de un año se ha degradado tan sólo en un 60 % y su liberación es de forma continuada. Al estar los niveles de Mg en sangre regulados por el riñón, el exceso es habitualmente excretado por la orina [134, 135]. Además, el esqueleto actúa como captador de este metal, dado que cerca del 50% del magnesio del cuerpo se almacena en los huesos [10].

Según Yuen [117], se considera asumible insertar anualmente en humanos implantes de 64-73 g de Mg. En el diseño experimental animal propuesto en esta investigación, equivaldría a implantes con 180-200 mg de Mg en un año. Nuestro implante de AZ31 contiene menos de 27 mg de Mg, por lo tanto 7 veces inferior a la dosis de seguridad propuesta por Yuen (para un 100% de degradación al año) o 12 veces inferior teniendo en cuenta que sólo se ha producido un 60% de degradación al año.

Respecto del F, éste sólo se halla en la capa superficial de MgF_2 de aquellos implantes que fueron sometidos al tratamiento con HF. El espesor medio de esta capa es de $3 \mu\text{m}$, por lo que el volumen completo de la capa del implante es tan sólo de $0,1 \text{ mm}^3$. Como la densidad del MgF_2 es de $3,15 \text{ mg cm}^{-3}$, y el 60% en peso de este compuesto corresponde al F, un implante con capa contiene aproximadamente $19 \cdot 10^{-5} \text{ mg}$ de F.

En humanos, el 90% del F se encuentra en los huesos y dientes [118]. Entre los tejidos blandos, la glándula pineal y los riñones son los órganos que más F acumulan, pudiendo alcanzar concentraciones hasta 5 veces superiores al resto de los órganos no óseos [136], y hasta 50 veces las concentraciones del plasma [137].

En un estudio llevado a cabo inyectando NaF subcutáneamente en conejos [138], sólo se advirtieron síntomas de fluorosis (nefritis, degeneración del epitelio tubular, etc) cuando se sobrepasó la dosis de $10 \text{ mg d}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$ de peso corporal, lo que para una rata de 200 g equivale a una cantidad de 0,73 g de F en un año; esto supone alrededor de $5 \cdot 10^6$ veces el peso total de F presente en la capa de nuestro implante.

De todo lo expuesto hasta aquí parece razonable descartar que Mg, Mn, Zn y F, en los niveles empleados en los implantes de este trabajo, pudieran producir toxicidad en el modelo animal planteado.

Respecto del Al, este elemento es potencialmente neurotóxico en humanos y animales de laboratorio [139] y se ha demostrado su acumulación en órganos tales como cerebro, huesos, riñón, sangre [140]. El Al produce especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres [141-144] que provocan la peroxidación de los lípidos (LPO) y la inhibición de enzimas antioxidantes en cerebro, hígado y riñón [144-156]. Igualmente se sospecha de su participación en enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer [117, 157-162], Parkinson y demencia [163], déficits del conocimiento y comportamentales [164, 165] y hepatotoxicidad [166]. También se ha establecido una asociación entre LPO en cerebro y aparición de Alzheimer [167].

El contenido total de Al en el cuerpo humano se estima entre 30 y 50 mg, de los cuales casi la mitad está en el esqueleto y un 25% en los pulmones [168]. Debroe [169] encuentra valores diferentes: el 40% del Al se hallaría en el hueso y otro 40% en el músculo, mientras que en cerebro sólo habría un 1%, otro 1% en hígado y 12% en los pulmones.

La dosis máxima tolerable de Al en ratas ha sido establecida de forma teórica en $1,64 \cdot 10^{-2} \text{ mg d}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$ de peso corporal [117]. Como el análisis por WDXRF de nuestra AZ31 ofrece niveles de Al del 3,37%, el límite teórico sería de $35,5 \text{ mg año}^{-1}$, aproximadamente 1,27 veces el peso de nuestro implante. Yuen introduce en su artículo un factor de seguridad de 10 veces para poder amortiguar las posibles variaciones inter-población (que haya individuos 10 veces más sensibles a los empleados en el estudio). Si no se aplicara ese límite de seguridad, equivaldría a un implante de unos 355 mg año^{-1} , que es aproximadamente 12 veces el empleado aquí, o 21 veces el peso de nuestro implante teniendo en cuenta un 60% de degradación en un año.

Entrando en el análisis cuantitativo, el estudio de la evolución temporal de la acumulación de trazas metálicas para el conjunto de los órganos muestra, como se puede apreciar en la tabla 4.4.1, un mayor contenido de los elementos Mg, Al y Mn a medida que el tiempo aumenta y una estabilización del Zn entre 9 y 13 meses.

Este incremento temporal únicamente es estadísticamente significativo para el Al, que además en el último periodo (9 a 13 meses) sigue aumentando. Esta tendencia aconseja extremar la prudencia, ya que se desconoce si a

mayores tiempos, no considerados en este estudio, este elemento puede continuar acumulándose.

Para descartar la posibilidad de que este incremento de trazas con el tiempo se debiera a otros factores ajenos a la inserción del implante se procedió a comparar ratas control y ratas portadores de implante a 13 meses.

Como se puede apreciar en la Tabla 4.4.2, todos los elementos analizados presentan un mayor nivel en las ratas con implantes con respecto a las ratas control, lo que demuestra que efectivamente existe una degradación del material del implante y que trazas de este material migran hasta los diversos órganos, donde se acumulan. De todos los elementos analizados, sólo el Al presenta una diferencia estadísticamente significativa.

Puesto que el único elemento que ha tenido un aumento significativo como resultado de la inserción del implante ha sido el Al y atendiendo a los posibles problemas de toxicidad relacionados con este elemento, se procedió a evaluar su presencia en los distintos órganos. Como puede apreciarse en la Figura 4.4.1, el contenido en Al aumenta en todos ellos.

Los pulmones es el órgano donde mayor acumulación se produce (casi 7 ppm), lo que concuerda con lo hallado por otros autores [125]. El siguiente órgano en cantidad es el bazo (5,4 ppm). Sin embargo, hablando en términos absolutos, es el hígado donde se acumula mayor cantidad de Al (Tabla 4.4.4 [c]) debido a ser el órgano más pesado (Tabla 4.4.4 [b]).

Respecto del hígado y el bazo, la presencia de Al se explica por su relación con el sistema inmune y como parte del proceso de excreción del organismo [91,

118, 169], lo que contribuye a limitar su toxicidad en estos órganos, en línea con lo indicado por Debroe [169]: *“El secuestro del Al en el hígado por los lisosomas de los hepatocitos y de la células de Kupffer y en el bazo por los macrófagos podría explicar la ausencia de toxicidad en ambos órganos”*. Este mecanismo está en concordancia con lo hallado por Witte en conejos [170], donde los productos de corrosión conteniendo Al que aún permanecían en la zona del implante, eran absorbidos por macrófagos. Es sabido que una de las funciones del bazo es la de filtrar células del sistema defensivo que han fagocitado elementos extraños al organismo.

La entrada del Al al cerebro no es fácil, pues la barrera hematoencefálica tiende a impedir su paso [171-173]. Como contrapartida, la tasa de desaparición del Al del cerebro es baja [172, 174] y se sospecha que puede concentrarse allí a lo largo de toda la vida [168, 175, 176].

Los valores medios de Al en cerebro de humanos sanos han sido establecidos por diversos autores en el intervalo 1-5 ppm (peso seco) [175, 177-179].

Nuestros datos, con un valor de 3,11 ppm en cerebro (peso seco), podrían considerarse dentro del rango de valores normales, aunque debemos recomendar precaución con el número y tamaño de implantes insertados para no sobrepasar el límite de seguridad. En el cerebro parece que existe una cierta estabilización a partir del noveno mes (Figura 4.4.1). De hecho, es el único órgano donde no se encuentran diferencias significativas (ANOVA > 0,05) entre 0 y 13 meses (Tabla 4.4.3).

La Tabla 4.4.4 presenta el contenido de Al órgano por órgano, comparando las ratas control con las que portaban implante. Se puede apreciar que el contenido de Al ha aumentado en todos los órganos de las ratas con implante con respecto a las que no lo llevan, y el cerebro es el único órgano donde las diferencias no son significativas.

Estos datos indican que, aunque ha habido un incremento perceptible de Al (Tabla 4.4.4 [a]), tan sólo una ínfima cantidad de la masa original del implante ha quedado retenida en dichos órganos (Tabla 4.4.4 [c]): un implante de 28 mg, con un 3,37 % de Al, contiene 0,94 mg de Al; el sumatorio del incremento de Al recuperado en los órganos muestreados supone un 3,95 % del total teórico existente en el implante (Tabla 4.4.4 [d]).

Estos resultados concuerdan con la información existente sobre estudios en medicación parenteral, que es la vía de entrada de Al a la sangre más similar a la de un implante (comparada con la oral o la inhalatoria). En adultos sanos un 99% de este Al es eliminado por vía renal (por la orina) y minoritariamente también por vía hepática (por la bilis) [180]. En estudios de inyección directa de Al²⁶ en humanos, tras 24 horas sólo el 0,5% permanecía en sangre [181, 182], por lo que el sistema de eliminación es muy eficiente. Este eficaz funcionamiento del sistema excretor junto a la deposición de productos de corrosión en las proximidades del implante son los dos principales mecanismos que explican la relativamente baja concentración de Al en los órganos estudiados, en línea con lo que apunta Witte [170]: *“Sólo una pequeña porción del aluminio se encuentra unido a la albúmina y es transportado fuera del torrente sanguíneo, principalmente hacia el esqueleto, el hígado, los riñones y el cerebro y cantidades mucho menores se acumulan en otros tejidos blandos”*. Únicamente en aquellos casos en que la

función renal está disminuida (p. ej. en ancianos, pacientes con riñones dañados, neonatos), el Al llega a acumularse en el organismo [183, 184].

Uno de los aspectos más innovadores de este estudio ha sido intentar una aproximación a una situación real de uso de la aleación AZ31 como material de síntesis de fracturas. Para evaluar la influencia que tendría la existencia de fractura en el hueso sobre el proceso de liberación de iones, se produjo una fractura controlada en parte de los animales experimentales. En la Tabla 4.4.5 pueden verse los resultados de las ANOVAs de la comparación entre los grupos con y sin fractura, para cada uno de los elementos metálicos y cada órgano estudiado, así como para el conjunto de órganos. Como todos los valores son superiores a 0,05, no se encontraron diferencias significativas (al 95% de confianza) que sean atribuibles al factor fractura.

El relativamente lento proceso de biodegradación del material es compatible con el proceso de consolidación de la fractura (entre 3 y 5 meses en la rata), sin que la biodegradación del material conlleve una pérdida crítica de propiedades mecánicas y funcionales.

Respecto del tratamiento en HF de la AZ31, los datos de la Tabla 4.4.6 muestran una comparación entre el grupo de ratas que portan implantes tratados en HF y el de implantes no tratados, tras 13 meses de permanencia del implante y no permiten sostener que el recubrimiento de MgF_2 creado en la superficie del implante tenga un efecto protector in vivo sobre la degradación de material AZ31. No obstante, y aunque no sea estadísticamente significativo, sí se advierte cierto efecto protector del recubrimiento durante los 4 primeros meses.

Estos resultados están en desacuerdo con Witte [111], el cual utiliza una capa de fluoruro que ralentiza la degradación del implante, pero en cambio coinciden con lo obtenido por Thomann [107], quien encuentra que no hay una disminución en la degradación a pesar de que la capa de flúor está aún presente tras seis meses de implante. Según parece indicar Thomann [107] apenas hay degradación dentro de la cavidad medular del hueso. En nuestros estudios la biodegradación al cabo de los 13 meses alcanza valores en torno al 60% del implante como se puede observar en la Figura 4.3.19. Como resumen a este apartado se puede concluir que efectivamente hay un aumento de trazas de Mg, Al y Mn con el tiempo, y que en el caso del Zn hay una estabilización entre los 9 y 13 meses. El incremento es estadísticamente significativo en el caso del Al. Los resultados de nuestras investigaciones son difíciles de contrastar en la bibliografía dado lo prolongado de nuestros ensayos hasta 13 meses, siendo habitual resultados hasta los 3 ó 6 meses. En este sentido este trabajo es pionero y a pesar de los tiempos de ensayo largos sólo se ha llegado hasta el 60% de la biodegradación del material, sería aconsejable continuar la experimentación hasta la biodegradación total del material implantado y analizar sus implicaciones sistémicas y toxicológicas.

Las concentraciones de trazas de Mg, Mn, Zn y F, en los niveles alcanzados y en los órganos analizados en este trabajo, no producen efectos sistémicos ni toxicológicos en el modelo animal planteado.

El Al, elemento al que se ha prestado especial atención por su toxicidad a nivel del sistema nervioso central, no ha alcanzado en el cerebro concentraciones estadísticamente significativas, siendo mayoritariamente eliminado por el riñón.

6 CONCLUSIONES

- 1.- De todos los materiales de base magnesio ensayados, por sus propiedades mecánicas y de resistencia a la corrosión, la aleación AZ31 ha resultado la más idónea para su posible empleo como material de osteosíntesis.
- 2.- La aleación AZ31 con recubrimiento de MgF_2 ha demostrado buena biocompatibilidad en cultivo celular con pre-osteoblastos y fibroblastos.
- 3.- Tras largos tiempos de inserción (13 meses), con un 60% de biodegradación de la AZ31, se ha producido la acumulación de trazas de Mg, Al, Zn y Mn en todos los órganos estudiados, pero sólo de manera significativa en el caso del Al, del que se ha retenido en los órganos estudiados únicamente el 3,95% de todo el Al presente en el implante.
- 4.- Ni la presencia de una fractura ni la modificación superficial del implante con MgF_2 han variado la concentración de las trazas metálicas acumuladas en los órganos estudiados.
- 5.- La respuesta local, sistémica y toxicológica a la inserción del implante de la aleación AZ31 permite afirmar que en el diseño animal planteado, esta aleación ofrece buenas posibilidades para ser usada como material de osteosíntesis.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Cotran, R.S.; Robbins, S.L.; Kumar, V.; Tucker, C. *Patología estructural y funcional*. 6ª ed. 2006: M. Graw-Hill.
2. Anselme, K., *Osteoblast adhesion on biomaterials*. *Biomaterials*, 2000. **21**(7): p. 667-681.
3. Li, S.L., A; Nannmark, U; Chien, S., *Interaction between cone marrow stem cells and extracellular matrix in bone cartilage*, in *The Osseointegration Book*, B. PI, Editor. 2005, Quintessence: Berlin. p. 115-26.
4. Olszta, M.J., et al., *Bone structure and formation: A new perspective*. *Materials Science & Engineering R-Reports*, 2007. **58**(3-5): p. 77-116.
5. Davies, J.H., MM., *Bone Formation and Healing: Histodynamics of Endosseous Wound Healing*, in *Bone Engineering*, D. JE, Editor. 1999, Davies JE: Toronto. p. 1-15.
6. Cowin, S., *The mechanical properties of cortical bone tissue*, in *Bone Mechanics*, S. Cowin, Editor. 1991, CRC Press: Philadelphia. p. 181.
7. Ontañón, M.A., C; Ginebra, MP; Planell, JA., *Structure and Mechanical Properties of Bone*, in *Structural Biological Materials*, E. M, Editor. 2000, Pergamon: Amsterdam. p. 31-71.
8. Comín, M.P., JL., *Comportamiento mecánico del tejido óseo*, in *Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación*, I.d.B.d. Valencia, Editor. 1999: Valencia. p. 35.
9. Nicoll, S.B., *Materials for Bone Graft Substitutes and Osseous Tissue Regeneration*, in *Biomaterials for Tissue Engineering Applications*, J.A.B.R.L. Mauck, Editor. 2011, Springer: Germany.
10. Rezwan, K., et al., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2006. **27**(18): p. 3413-3431.
11. Khan, S.N., et al., *The biology of bone grafting*. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2005. **13**(1): p. 77-86.
12. Kneser, U., et al., *Tissue engineering of bone*. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, 2002. **11**(3): p. 107-116.
13. Williams, D., *Definitions in biomaterials*, E.S. Ltd, Editor. 1987.
14. *Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials*. 1992: Chester, U.K.
15. Xue, W.C., et al., *In vivo evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings having different crystallinity*. *Biomaterials*, 2004. **25**(3): p. 415-421.

16. Hoffmann, B., M. Feldmann, and G. Ziegler, *Sol-gel and precursor-derived coatings with cover function on medical alloys*. Journal of Materials Chemistry, 2007. **17**(38): p. 4034-4040.
17. Ehrlich, H., *Biological Materials of Marine Origin: Invertebrates*. 2010: Springer.
18. Branemark, P.I., et al., *Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies*. Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery, 1969. **3**(2): p. 81-100.
19. Kulkarni, R.M., RG; Hegyeli, AF; Leonard, F., *Biodegradable poly(lactic acid) polymers*. Journal of Biomedical Materials Research, 1971. **5**: p. 169-181.
20. Kulkarni, R.P., KC; Neuman, C; Leonard, F., *Poly(lactic Acid) for Surgical Implants*. Archives of Surgery, 1966. **93**(5): p. 839-45.
21. Barber, F., *Resorbable fixation devices: a product guide*. Orthopaedic 1998. **4**: p. 1111-17.
22. Ciccone W, M.C., Bentley C, Tasto J., *Bioabsorbable Implants in Orthopaedics: New Developments and Clinical Applications*. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 2001. **9**: p. 280-288.
23. Vallet-Regí, M.M., L., *Ceramics as bone repair materials*, in *Bone repair biomaterials*, J.A. Planell, Editor. 2009, CRC. p. 194-230.
24. González-Carrasco, J.L., *Metals as bone repair materials*, in *Bone repair biomaterials*, J.A. Planell, Editor. 2009, CRC. p. 154-193.
25. Mateos-Timoneda, M.A., *Polymers for bone repair*, in *Bone repair biomaterials*, J.A. Planell, Editor. 2009, CRC. p. 231-251.
26. Barrows, T., *Degradable implants materials: a review of synthetic absorbable polymers and their applications*. Clinical Materials, 1986. **1**: p.:233-267.
27. Dunn, R., *Clinical applications and update on the poly(alpha-hydroxy acids)*. in *Biomedical applications of synthetic biodegradable polymers*, H. JO, Editor. 1995, CRC Press: Boca Raton. p. 17-31.
28. Heller, J.D., A.U. , *Poly(orthoesters)*. in *Biomedical polymers designed to degrade systems*, S. S, Editor. 1994, Hanser: New York. p. 35-68.
29. Kohn, J.L., R., *Bioresorbable and bioerodible materials*, in *Biomaterials Science.*, H.A. Ratner BD, Schoen F, Lemons J., Editor. 1996, Academic Press: New York. p. 64-72.
30. Shalaby, S., *Synthetic absorbable polyesters*, in *Biomedical Polymers.*, S. S, Editor. 1994, Hanser: New York. p. 1-34.

31. Wong, J.Y.B., J.; Peterson, D. R., *Biomaterials principles and practices*. 2013: CRC Press.
32. Pilliar, R.M., et al., *Bone ingrowth and stress shielding with a porous surface coated fracture fixation plate*. Journal of Biomedical Materials Research, 1979. **13**(5): p. 799-810.
33. Woo, S.L.Y., et al., *Comparison of cortical bone atrophy secondary to fixation with plates with large differences in bending stiffness*. Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume, 1976. **58**(2): p. 190-195.
34. Vert, M.C., P; Chabot, F., *Bioresorbable plastic materials for bone surgery*, in *Macromolecular Biomaterials*, G.D. Hastings, P., Editor. 1984, CRC Press: Boca Raton, FL. p. 119-142.
35. Paavolainen, P., et al., *Effect of rigid plate fixation on structure and mineral-content of cortical bone*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1978(136): p. 287-293.
36. Slatis, P., et al., *Structural-changes in intact tubular bone after application of rigid plates with and without compression*. Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume, 1978. **60**(4): p. 516-522.
37. Lugowski, S.J., et al., *Release of metal-ions from dental implant materials invivo - determination of Al, Co, Cr, Mo, Ni, V, and Ti in organ tissue*. Journal of Biomedical Materials Research, 1991. **25**(12): p. 1443-1458.
38. Gil, F.J., *Biometales*, in *Biomateriales*, S.d.A. R. Sastre, and J. San Román, Editor. 2004, Faenza Editrice. p. 17-26.
39. Misch, C.S., JT; Bidez, MW., *Fundamentos científicos para el diseño de los implantes dentales.*, in *Implantología Contemporánea*, M. CE, Editor. 2009, Elsevier Mosby: Barcelona. p. 200-29. .
40. *Materials Properties Handbook: Titanium Alloys*, ed. C.E. Boyer R. Welsh G. 1994, Materials Park: ASM International.
41. Bobyn, J.D., et al., *Producing and avoiding stress shielding - laboratory and clinical observations of noncemented total hip-arthroplasty*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1992(274): p. 79-96.
42. Mur, F.J.G., *Aleaciones ligeras*. 2001, barcelona: UPC.
43. Friedrich, H.E. and B.L. Mordike, *Magnesium Technology*. . 2006, Germany: Springer.

44. Luo, A.A., *Magnesium casting technology for structural applications*. Journal of Magnesium and Alloys, 2013. **1**: p. 2-22.
45. Williams, G., N. Birbilis, and H.N. McMurray, *The source of hydrogen evolved from a magnesium anode*. Electrochemistry Communications, 2013. **36**: p. 1-5.
46. Pitto, R.P., et al., *Quantitative computer-assisted osteodensitometry in total hip arthroplasty*. International Orthopaedics, 2007. **31**(4): p. 431-438.
47. White, A.A.B., S. M., *Properties and characterisation of bone repair materials*, in *Bone Repair Biomaterials*, S.M.B. J A Planell, D Lacroix and A Merolli, Editor. 2009, Woodhead Publishing.
48. Anderson, J.M., *Biological responses to materials*. Annual Review of Materials Research, 2001. **31**: p. 81-110.
49. Ratner, B.H., A; Schoen, F; Lemons, J., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 3 ed. 2013, Canada: Academic Press.
50. Manuel, M.V. and N. Hort, *Magnesium: An Essential Nutrient for a Good Biomaterial*. Jom, 2011. **63**(4): p. 99-99.
51. Zardiackas, L.D., LD., *Failure Analysis of Metallic Orthopaedic Devices*, in *Encyclopaedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part B*. 1998, Marcel Dekker Inc: New York.
52. Latour, R., *Fiber-Reinforced Composite Biomaterial for Orthopaedic Implant Applications*, in *Encyclopaedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering Part B*. 1998, Marcel Dekker Inc: New York.
53. Senn, N., *I. A New Method of Direct Fixation of the Fragments in Compound and Ununited Fractures*. Annals of surgery, 1893. **18**(2): p. 125-51.
54. Groves, E.W.H., *Ununited fractures, with special reference to gunshot injuries and the use of bone grafting*. British Journal of Surgery, 1918. **6**(22): p. 203-247.
55. Rush, L.R., H.L., *A reconstructive operation for comminuted fractures of the upper third of the ulna*. American journal of surgery, 1937. **38**: p. 332-333.
56. Huse, E.C., *A new ligature?* Chicago Med J Exam, 1878: p. 172.
57. Witte, F., *The history of biodegradable magnesium implants: A review*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(5): p. 1680-1692.
58. Lambotte, A., *L'utilisation du magnésium comme matériel perdu dans l'ostéosynthèse*. Bull Mém Soc Nat cir, 1932. **28** p. 1325-34.

59. Andrews, E.W., *Absorbable metal clips as substitutes for ligatures and deep sutures in wound closure*. Journal of the American Medical Association, 1917. **69**: p. 278-281.
60. Selig, M.G., *A study of magnesium wire as an absorbable suture and ligature material*. Archives of Surgery, 1924. **8**(2): p. 669-680.
61. McBride, E.D., *Magnesium screw and nail transfixion in fractures*. South Med J 1938. **31**(5): p. 508-15.
62. Ghali, E., W. Dietzel, and K.U. Kainer, *General and localized corrosion of magnesium alloys: A critical review*. Journal of Materials Engineering and Performance, 2004. **13**(1): p. 7-23.
63. Ambat, R., N.N. Aung, and W. Zhou, *Evaluation of microstructural effects on corrosion behaviour of AZ91D magnesium alloy*. Corrosion Science, 2000. **42**(8): p. 1433-1455.
64. Song, G.L. and A. Atrens, *Corrosion mechanisms of magnesium alloys*. Advanced Engineering Materials, 1999. **1**(1): p. 11-33.
65. Lafront, A.M., et al., *Pitting corrosion of AZ91D and AJ62x magnesium alloys in alkaline chloride medium using electrochemical techniques*. Electrochimica Acta, 2005. **51**(3): p. 489-501.
66. Mathieu, S., et al., *A corrosion study of the main constituent phases of AZ91 magnesium alloys*. Corrosion Science, 2003. **45**(12): p. 2741-2755.
67. Saris, N.E.L., et al., *Magnesium - An update on physiological, clinical and analytical aspects*. Clinica Chimica Acta, 2000. **294**(1-2): p. 1-26.
68. Li, L.C., J.C. Gao, and Y. Wang, *Evaluation of cyto-toxicity and corrosion behavior of alkali-heat-treated magnesium in simulated body fluid*. Surface & Coatings Technology, 2004. **185**(1): p. 92-98.
69. Song, G., *Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys*. Corrosion Science, 2007. **49**(4): p. 1696-1701.
70. Song, G. and S. Song, *A possible biodegradable magnesium implant material*. Advanced Engineering Materials, 2007. **9**(4): p. 298-302.
71. Alvarez-Lopez, M., et al., *Corrosion behaviour of AZ31 magnesium alloy with different grain sizes in simulated biological fluids*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(5): p. 1763-1771.
72. Gupta, M.S., N. M. L., *Magnesium, Magnesium Alloys, and Magnesium Composites*. 2011, Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons.

73. Makar, G.L. and J. Kruger, *Corrosion of magnesium*. International Materials Reviews, 1993. **38**(3): p. 138-153.
74. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941–2953.
75. Pourbaix, M., *Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions*. 1974, Houston: NACE.
76. Song, G. and A. Atrens, *Recent insights into the mechanism of magnesium corrosion and research suggestions*. Advanced Engineering Materials, 2007. **9**(3): p. 177-183.
77. Singh, R.D., N. B., *Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials*. J. Mater. Sci.: Mater. Med, 2007. **18**: p. 725–751.
78. Carboneras, M., et al., *Corrosion protection of different environmentally friendly coatings on powder metallurgy magnesium*. Journal of Alloys and Compounds, 2010. **496**(1-2): p. 442-448.
79. Carboneras, M., et al., *Corrosion behaviour and in vitro/in vivo biocompatibility of surface-modified AZ31 alloy*. Revista De Metalurgia, 2011. **47**(3): p. 212-223.
80. Lozano, R.M., et al., *Response of MC3T3-E1 osteoblasts, L929 fibroblasts, and J774 macrophages to fluoride surface-modified AZ31 magnesium alloy*. J Biomed Mater Res A, 2013. **101**(10): p. 2753-62.
81. Chiu, K.Y., et al., *Characterization and corrosion studies of fluoride conversion coating on degradable Mg implants*. Surface & Coatings Technology, 2007. **202**(3): p. 590-598.
82. Lozano, R.M.P.-M., B.T. ; Iglesias, C.; Rubio, J.C.; Clemente, C.; Carboneras, M.; del Valle, J.A.; García-Alonso, M.C.; Escudero, M.L. , *Degradación de biomateriales reabsorbibles de base Mg en cultivos celulares de osteoblastos e in vivo*, in *XXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica, CASEIB*,. 2009, Actas del XXVII Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomedica.: Cádiz, España. p. 39-41.
83. Carboneras, M., M.C. Garcia-Alonso, and M.L. Escudero, *Biodegradation kinetics of modified magnesium-based materials in cell culture medium*. Corrosion Science, 2011. **53**(4): p. 1433-1439.

84. Doyle, A.G., J.B.; Newell, D.G., *Testing for Microbial contamination*, in *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, A.G. Doyle, J.B.; Newell, D.G., Editor. 1995, John Wiley & Sons Ltd: England. p. 7A:1.2.
85. Yushkevich, P.A., et al., *User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability*. Neuroimage, 2006. **31**(3): p. 1116-1128.
86. Donath, K. and G. Breuner, *A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft-tissues - the sage-schliff (sawing and grinding) technique*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 1982. **11**(4): p. 318-326.
87. Coedo, A.G., et al., *Evaluation of flow injection sample to standard addition method for the inductively coupled plasma mass spectrometric determination of aluminium in biological tissues*. Journal of Mass Spectrometry, 1996. **31**(4): p. 427-432.
88. Okazaki, Y., et al., *Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants*. Biomaterials, 2004. **25**(28): p. 5913-5920.
89. Okazaki, Y. and E. Goth, *Metal release from stainless steel, Co-Cr-Mo-Ni-Fe and Ni-Ti alloys in vascular implants*. Corrosion Science, 2008. **50**(12): p. 3429-3438.
90. Rubio, J.C., et al., *Determination of metallic traces in kidneys, livers, lungs and spleens of rats with metallic implants after a long implantation time*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2008. **19**(1): p. 369-375.
91. Sarmiento-Gonzalez, A., et al., *Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **393**(1): p. 335-343.
92. Inkielewicz, I. and J. Krechniak, *Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water*. Fluoride, 2003. **36**(4): p. 263-266.
93. Friedrich, H.E.M., B. L., *Magnesium Technology*. 2006, Heidelberg, Germany: Springer.
94. German, R.M., *Powder Metallurgy Science*. 2^a ed. 1994, Princeton: Metal Powder Industry.
95. Fischerauer, S.F., et al., *In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats*. Acta Biomater, 2013. **9**(2): p. 5411-20.

96. Dziuba, D., et al., *Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**(10): p. 8548-8560.
97. Virtanen, S., *Biodegradable Mg and Mg alloys: Corrosion and biocompatibility*. Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials, 2011. **176**(20): p. 1600-1608.
98. Yan, T., et al., *Fluoride treatment and in vitro corrosion behavior of an AZ31B magnesium alloy*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2010. **30**(5): p. 740-748.
99. Yan, T., et al., *Fluoride Conversion Coating on Biodegradable AZ31B Magnesium Alloy*. Journal of Materials Science & Technology, 2014. **30**(7): p. 666-674.
100. Narayanan, T.S.N.S., I.S. Park, and M.H. Lee, *Tailoring the composition of fluoride conversion coatings to achieve better corrosion protection of magnesium for biomedical applications*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(21): p. 3365-3382.
101. Gu, X., et al., *In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys*. Biomaterials, 2009. **30**(4): p. 484-498.
102. Witte, F., et al., *In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys*. Biomaterials, 2006. **27**(7): p. 1013-1018.
103. Xu, L., et al., *In vitro corrosion behaviour of Mg alloys in a phosphate buffered solution for bone implant application*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2008. **19**(3): p. 1017-1025.
104. Chou, D.-T., et al., *In vitro and in vivo corrosion, cytocompatibility and mechanical properties of biodegradable Mg-Y-Ca-Zr alloys as implant materials*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**(10): p. 8518-8533.
105. Guo, H.-x., et al., *Corrosion behavior of micro-arc oxidation coating on AZ91D magnesium alloy in NaCl solutions with different concentrations*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2012. **22**(7): p. 1786-1793.
106. Staiger, M.P., et al., *Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1728-1734.
107. Thomann, M., et al., *Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants (MgCa0.8) on degradation in a rabbit model*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **93A**(4): p. 1609-1619.

108. Castellani, C., et al., *Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control*. Acta Biomater, 2011. **7**(1): p. 432-40.
109. Erdmann, N., et al., *Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: A comparative in vivo study in rabbits*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(3): p. 1421-1428.
110. Willbold, E. and F. Witte, *Histology and research at the hard tissue-implant interface using Technovit 9100 New embedding technique*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(11): p. 4447-4455.
111. Witte, F., et al., *Degradable biomaterials based on magnesium corrosion*. Current Opinion in Solid State & Materials Science, 2008. **12**(5-6): p. 63-72.
112. Kirkland, N.T., N. Birbilis, and M.P. Staiger, *Assessing the corrosion of biodegradable magnesium implants: A critical review of current methodologies and their limitations*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(3): p. 925-936.
113. Witte, F., et al., *In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3557-3563.
114. del Valle, J.A. and O.A. Ruano, *Superplasticity in a magnesium alloy prepared with bimodal grain size distributions developed by dynamic recrystallisation*. Materials Letters, 2008. **62**(19): p. 3391-3394.
115. Wang, J., et al., *Surface modification of magnesium alloys developed for bioabsorbable orthopedic implants: A general review*. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2012. **100B**(6): p. 1691-1701.
116. Montoya, R., et al., *Modeling in vivo corrosion of AZ31 as temporary biodegradable implants. Experimental validation in rats*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2014. **41**: p. 127-133.
117. Yuen, C.K. and W.Y. Ip, *Theoretical risk assessment of magnesium alloys as degradable biomedical implants*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(5): p. 1808-1812.
118. WHO, *Trace Elements In Human Nutrition - Report of a Who Expert Committee - World-Health-Organization*. Who Chronicle, 1974. **28**(1): p. 41-42.
119. Nielsen, F., *Ultratrace elements*, in *Modern nutrition in health and disease*, M.E. Shils, et al., Editors. 1999, Williams & Wilkins: Baltimore. p. 283-303.
120. Hathcock, J., *Vitamin and Mineral Safety*. 2nd ed. 2004, Washington, DC. Chapter 26.

121. Jankovic, J., *Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease*. Neurology, 2005. **64**(12): p. 2021-2028.
122. WHO, *Manganese*, in *Air Quality Guidelines for Europe series.*, W.H. Organization., Editor. 2000: Copenhagen, Denmark. p. 154-156.
123. ATSDR, *Toxicological Profile for Manganese*, A.f.T.S.a.D.R. (ATSDR). Editor. 2012: US. p. 14-16.
124. Hildebrand, H. and J.C. Hornez, *Biological Response and Biocompatibility*, in *Metals as Biomaterials*, J.A. Helsen and H.J. Breme, Editors. 1998, Wiley. p. 268.
125. Yu, K., et al., *In vivo biocompatibility and biodegradation of a Mg-15%Ca-3(PO₄)₂ composite as an implant material*. Materials Letters, 2013. **98**: p. 22-25.
126. EGVM, *Magnesium Risk Assessments*, in *Safe upper levels for vitamins and minerals*, U.F.S. Agency, Editor. 2003. p. 287-292.
127. WHO, *Magnesium*, in *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*, W.H. Organization, Editor. 2004: Geneva, Italy. p. 217–229.
128. Harper, K. and B.S. Eley, *Near-fatal hypermagnesaemia - Time to revisit over-the-counter medication*. Samj South African Medical Journal, 2002. **92**(3): p. 211-212.
129. Birrer, R.B., A.J. Shallash, and V. Totten, *Hypermagnesemia-induced fatality following Epsom salt gargles*. Journal of Emergency Medicine, 2002. **22**(2): p. 185-188.
130. Valentini, J., et al., *Human erythrocyte delta-aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients*. Clinical Biochemistry, 2007. **40**(9-10): p. 591-594.
131. Feyerabend, F., et al., *Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(5): p. 1834-1842.
132. Li, Z., et al., *The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone*. Biomaterials, 2008. **29**(10): p. 1329-1344.
133. Witte, F., et al., *Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Peri-implant bone remodeling*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. **81A**(3): p. 757-765.

134. Xu, L., et al., *In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. **83A**(3): p. 703-711.
135. Reifenrath, J., D. Bormann, and A. Meyer-Lindenberg, *Magnesium alloys as promising degradable implant materials in orthopaedic research*, in *Magnesium Alloys - Corrosion and Surface Treatments*, F. Czerwinski, Editor. 2011. p. 93-108.
136. Whitford, G.M., *The metabolism and toxicity of fluoride*. Monographs in oral science, 1996. **16 Rev 2**: p. 1-153.
137. Council, N.R., *Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA's Standards.*, Washington D.C.
138. Shashi, A., J.P. Singh, and S.P. Thapar, *Toxic effects of fluoride on rabbit kidney*. Fluoride, 2002. **35**(1): p. 38-50.
139. El-Demerdash, F.M., *Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2004. **18**(1): p. 113-121.
140. Oteiza, P.I., et al., *Aluminum accumulation and neurotoxicity in swiss-webster mice after long-term dietary exposure to aluminum and citrate*. Metabolism-Clinical and Experimental, 1993. **42**(10): p. 1296-1300.
141. Strong, M.J., et al., *Can the mechanisms of aluminum neurotoxicity be integrated into a unified scheme?* Journal of Toxicology and Environmental Health, 1996. **48**(6): p. 599-613.
142. Prakash, N.T. and K.S.J. Rao, *Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve perna-viridis during heavy-metal exposure*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1995. **146**(2): p. 107-113.
143. Nehru, B. and P. Anand, *Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005. **19**(2-3): p. 203-208.
144. Ranjbar, A., et al., *Alteration of body total antioxidant capacity and thiol molecules in human chronic exposure to aluminum*. Toxicological & Environmental Chemistry, 2008. **90**(4): p. 707-713.

145. Mohammadirad, A. and M. Abdollahi, *A Systematic Review on Oxidant/Antioxidant Imbalance in Aluminium Toxicity*. International Journal of Pharmacology, 2011. **7**(1): p. 12-21.
146. Bhalla, P. and D.K. Dhawan, *Protective Role of Lithium in Ameliorating the Aluminium-induced Oxidative Stress and Histological Changes in Rat Brain*. Cellular and Molecular Neurobiology, 2009. **29**(4): p. 513-521.
147. Sanchez-Iglesias, S., et al., *Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease*. Journal of Neurochemistry, 2009. **109**(3): p. 879-888.
148. Stevanovic, I.D., et al., *Effects of L-NAME, a non-specific nitric oxide synthase inhibitor, on AlCl₃-induced toxicity in the rat forebrain cortex*. Journal of Veterinary Science, 2009. **10**(1): p. 15-22.
149. Luo, Y., et al., *Protective effects of icariin against learning and memory deficits induced by aluminium in rats*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2007. **34**(8): p. 792-795.
150. Mahieu, S., et al., *Melatonin reduces oxidative damage induced by aluminium in rat kidney*. Toxicology Letters, 2009. **190**(1): p. 9-15.
151. Sharma, P. and K.P. Mishra, *Aluminum-induced maternal and developmental toxicity and oxidative stress in rat brain: Response to combined administration of Tiron and glutathione*. Reproductive Toxicology, 2006. **21**(3): p. 313-321.
152. Sharma, P., et al., *Role of combined administration of Tiron and glutathione against aluminum-induced oxidative stress in rat brain*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2007. **21**(1): p. 63-70.
153. Abubakar, M.G., A. Taylor, and G.A.A. Ferns, *Regional accumulation of aluminium in the rat brain is affected by dietary vitamin E*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2004. **18**(1): p. 53-59.
154. Zatta, P., E. Lain, and C. Cagnolini, *Effects of aluminum on activity of Krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(10): p. 3049-3055.
155. Zatta, P., et al., *In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase*. Brain Research Bulletin, 2002. **59**(1): p. 41-45.

156. Kaneko, N., T. Sugioka, and H. Sakurai, *Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: Insight into cellular damage caused by oxidative stress*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2007. **101**(6): p. 967-975.
157. Zatta, P., *Aluminum and Alzheimer's disease: A Vexata Questio between uncertain data and a lot of imagination*. Journal of Alzheimers Disease, 2006. **10**(1): p. 33-37.
158. Gupta, V.B., et al., *Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad?* Cellular and Molecular Life Sciences, 2005. **62**(2): p. 143-158.
159. Bulat, P., B. Potkonjak, and I. Dujic, *Lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity erythrocytes of workers occupationally exposed to aluminium*. Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju, 2008. **59**(2): p. 81-87.
160. Liao, Y.-H., et al., *Lipid peroxidation in workers exposed to aluminium, gallium, indium, arsenic, and antimony in the optoelectronic industry*. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 2006. **48**(8): p. 789-793.
161. Sargazi, M., A. Shenkin, and N.B. Roberts, *Aluminium-induced injury to kidney proximal tubular cells: Effects on markers of oxidative damage*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2006. **19**(4): p. 267-273.
162. Bonnefont-Rousselot, D., et al., *Blood oxidative stress status in patients with macrophagic myofasciitis*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2004. **58**(9): p. 516-519.
163. Erasmus, R.T., et al., *Hyperaluminemia associated with liver-transplantation and acute-renal-failure*. Clinical Transplantation, 1995. **9**(4): p. 307-311.
164. Altmann, P., et al., *Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident*. British Medical Journal, 1999. **319**(7213): p. 807-811.
165. Sjögren, B., et al., *Occupational aluminium exposure and its health effects*, in *Research Issues in Aluminum Toxicity*, R.A. Yokel and M.S. Golub, Editors. 1997, Taylor & Francis: Washington, U.S. p. 165–183.
166. Chainy, G.B.N., L. Samanta, and N.B. Rout, *Effect of aluminium on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation of rat liver*. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 1996. **94**(2): p. 217-220.
167. Xie, C.X. and R.A. Yokel, *Aluminum facilitation of iron-mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminum and iron*

- concentrations*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **327**(2): p. 222-226.
168. Ganrot, P.O., *Metabolism and possible health-effects of aluminum*. Environmental Health Perspectives, 1986. **65**: p. 363-441.
 169. Debroe, M.E., et al., *Measuring aluminum in serum and tissues - overview and perspectives*. Nefrologia, 1986. **6**: p. 41-46.
 170. Witte, F., et al., *Biodegradable magnesium scaffolds: Part I: Appropriate inflammatory response*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. **81A**(3): p. 748-756.
 171. Yokel, R.A. and P.J. McNamara, *Aluminium toxicokinetics: An updated MiniReview*. Pharmacology & Toxicology, 2001. **88**(4): p. 159-167.
 172. Yokel, R.A., D.D. Allen, and D.C. Ackley, *The distribution of aluminum into and out of the brain*. Journal of Inorganic Biochemistry, 1999. **76**(2): p. 127-132.
 173. Zatta, P.F., N. M., and B. Corain, *Aluminium (III) toxicity and blood-brain barrier permeability*, in *Aluminium in Chemistry, Biology and Medicine*, M. Nicolini, P.F. Zatta, and B. Corain, Editors. 1991, Raven Press: New York, U.S. p. 97–112.
 174. Sanchez-Iglesias, S., et al., *Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2007. **21**: p. 31-34.
 175. Markesbery, W.R., et al., *Brain trace-element concentrations in aging*. Neurobiology of Aging, 1984. **5**(1): p. 19-28.
 176. Priest, N.D., *The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update*. Journal of Environmental Monitoring, 2004. **6**(5): p. 375-403.
 177. Tipton, I.H. and M.J. Cook, *Trace elements in human tissue. II. Adult subjects from the United States*. Health physics, 1963. **9**: p. 103-45.
 178. Bjertness, E., et al., *Content of brain aluminum is not elevated in Alzheimer disease*. Alzheimer Disease & Associated Disorders, 1996. **10**(3): p. 171-174.
 179. Hamilton, E.I., M.J. Minski, and J.J. Cleary, *The concentration and distribution of some stable elements in healthy human tissues from the United Kingdom—an environmental study*. Sci. Total Environ, 1973. **1**: p. 341–74.
 180. Hernandez-Sanchez, A., P. Tejada-Gonzalez, and M. Arteta-Jimenez, *Aluminium in parenteral nutrition: a systematic review*. European Journal of Clinical Nutrition, 2013. **67**(3): p. 230-238.

181. Priest, N.D., et al., *Human metabolism of al-26 and ga-67 injected as citrates*. *Human & Experimental Toxicology*, 1995. **14**(3): p. 287-293.
182. Priest, N.D., D. Newton, and R.J. Talbot, *Metabolism of aluminum-26 and gallium-67 in a volunteer following their injection as citrates*, in *AEA Technology Report*. 1991.
183. Gura, K.M., *Aluminum contamination in products used in parenteral nutrition: Has anything changed?* *Nutrition*, 2010. **26**(6): p. 585-594.
184. Klein, G.L., *Aluminum contamination of parenteral nutrition solutions and its impact on the pediatric patient*. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 2003. **18**(4): p. 302-7.