

Capítulo

6

Estudio de la biocompatibilidad

6.1 INTRODUCCIÓN

La necesidad del estudio de la biocompatibilidad surge del reconocimiento de la diferencia existente entre tejido vivo y los materiales no viables. Es bien conocida la existencia de una elevada interacción entre tejido y un material implantado, apareciendo efectos tanto beneficiosos como perniciosos.

Dada la definición de biomaterial (material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo), el estudio de la biocompatibilidad se entiende como la descripción y caracterización de una respuesta reproducible por parte del tejido biológico relativo a los materiales estudiados.

A partir del desarrollo de los biomateriales, es posible definir cuatro fases o tipos de biomateriales según la respuesta del organismo [Bla92]:

- Fase 1. Inerte: materiales implantables que generan poca o ninguna respuesta.
- Fase 2. Interactivo: materiales implantables que están diseñados para generar una respuesta específica y beneficiosa.
- Fase 3. Viable: materiales implantables, posiblemente con incorporación de células vivas, que son tratados por el organismo como tejido normal y son reabsorbidos o remodelados raras veces.
- Fase 4. Replante: materiales implantables consistentes de tejido nativo, desarrollado *in vitro* a partir de células previamente obtenidas del paciente.

Dado que el titanio es un material que no está diseñado para elicitarse respuestas favorables, en el caso del material estudiado en esta Tesis Doctoral, es necesario estudiar si es un material de fase 1.

Si un metal está en contacto directo con los tejidos, entonces es prácticamente seguro que se producirá algún tipo de liberación de iones en mayor o menor grado [Wil81]. Ahora bien, no todos los iones metálicos

tienen el mismo efecto en el organismo. Algunos iones, como los iones ferroso y férrico, están presentes habituales en el organismo. Algunos iones son elementos traza con funciones biológicas conocidas, como los iones trivalentes de cromo. Otros son tan raros en la naturaleza que no tienen roles metabólicos en el organismo, por lo que su liberación en el organismo genera concentraciones varios órdenes de magnitud por encima de sus niveles normales [Bla92]. Por ello, es necesario considerar la respuesta de los tejidos a las concentraciones producidas por la liberación de iones de dichos elementos, ya que, por ejemplo, si bien el titanio es tolerado en grandes concentraciones, no ocurre lo mismo con el aluminio [Wil81].

Para estudiar la liberación y el efecto de los iones metálicos en las células y tejidos, se pueden realizar estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*. Si bien los experimentos más completos se realizan en modelos *in vivo*, la presión social existente en los países industrializados en contra de la experimentación científica con animales vivos, así como los avances existentes en la experimentación *in vitro*, como la sustitución de los métodos de marcado radiactivo o con reactivos altamente tóxicos por marcadores más inocuos (tales como sustancias fosforescentes [She99]) han hecho más fácil la realización de este tipo de estudios con experimentos realizados en cultivos celulares, como son el estudio de cambios morfogénéticos, el análisis del dañado celular, análisis de la reproducción celular y el análisis de aspectos específicos del metabolismo celular [Kir98].

A pesar de ello, el estudio de los efectos acumulativos de los iones metálicos en los diferentes órganos, el estudio de posibles remodelaciones de los tejidos, así como su interrelación, es difícil de realizar mediante estudios *in vitro*.

En el presente trabajo se ha estudiado *in vivo* la liberación de iones y el efecto sobre los tejidos vivos de implantes de la aleación Ti6Al4V con tratamiento termoquímico de nitruración, así como de implantes de Ti6Al4V no tratados como control. No se han realizado estudios de muestras de titanio cp nitrurado

ya que diversos trabajos lo han mostrado como un material implantable sin efectos tóxicos [Bra93, Kno92].

Tanto los estudios sobre liberación de iones como los estudios de los efectos histológicos de los implantes se han llevado a cabo en un modelo animal. El número de animales usados ha sido reducido al mínimo imprescindible. En todos los casos, los animales han sido mantenidos, tratados y eutanasiados de acuerdo con las directrices indicadas por el NIH (*National Institute of Health*) en referencia a las prácticas correctas con animales de laboratorio [NIH85].

6.1.1 Liberación de iones

6.1.1.1 Estudios realizados *in vitro*

Se han realizado diversos estudios de la disolución del titanio cp y sus aleaciones *in vitro*. Se ha estudiado la cinética de disolución del titanio sumergido en fluido corporal simulado, en condiciones electroquímicas pasivas [Hea96]. En el caso del titanio, su comportamiento como material es relativamente inerte, debido a una capa protectora de óxido de titanio. Sin embargo, su comportamiento como elemento es muy reactivo, lo que explica la rápida formación de una capa protectora de óxido.

Los resultados mostraron que, en todas las condiciones estudiadas, el espesor de la capa protectora de óxido de titanio aumentaba con el tiempo de inmersión, al tiempo que la superficie se hidroxilaba e incorporaba elementos del electrolito, tales como iones calcio y fósforo. La liberación de iones medida disminuía con el tiempo de inmersión, debido al incremento del espesor de la capa de óxido, el cual reducía el potencial eléctrico que asiste al transporte de iones de titanio.

Otros estudios se dedicaron al estudio de la aleación Ti6Al4V, ya que el titanio usado en prótesis y en parte de los implantes se usa generalmente en forma de esta aleación [Ste80]. Como ya se ha indicado anteriormente, el aluminio es un elemento traza no esencial, que en elevadas concentraciones ha sido asociado a defectos en la formación ósea y a enfermedades cerebrales. Sin embargo, el aluminio es un elemento ubicuo, que se halla en concentraciones elevadas en el suelo, en el agua y en la dieta. En el caso del vanadio, está presente en la dieta sólo como elemento traza. Se han presentados estudios *in vitro* que muestran una elevada citotoxicidad por parte de este elemento, si bien no se ha logrado relacionar dicho efecto con su comportamiento en el cuerpo humano. Otros estudios, sin embargo, han demostrado que, si bien la incorporación del titanio a las células es aproximadamente proporcional a la concentración, mientras que el vanadio prácticamente no es absorbido, e incluso decrece el grado de absorción con la presencia de titanio [Mer96]. Los diferentes resultados existentes evidencian la dificultad asociada

al estudio de la absorción y efecto de los iones metálicos en las células y tejidos vivos.

6.1.1.2 Estudios realizados *in vivo*

En el caso del titanio, en los años sesenta se examinaron por vez primera los niveles sistémicos de titanio en tejidos de conejo en presencia de un implante de titanio cp [Fer60]. Tras seis meses de implantación, los contenidos de iones de titanio de los tejidos de los conejos implantados eran similares a los niveles del grupo control, si bien se observó un incremento de la concentración de iones titanio en un factor 20 en los tejidos cercanos al implante. En otro estudio dedicado al estudio del efecto de la implantación de titanio poroso se usaron conejos como modelo animal [Bia96]. En este caso, implantes porosos de titanio cp grado 1 (Tifelt®) en forma de disco fueron situados en la tibia de los conejos, mientras se mantenía un grupo no implantado como control. Las medidas de la concentración de iones, realizadas a diferentes intervalos (1, 4 y 12 meses), tampoco apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo implantado y el control, ni tampoco un incremento con el tiempo de implantación, si bien se apreció un ligero aumento de la concentración de titanio en el bazo.

Respecto al Ti6Al4V, en un estudio en el que se usaron monos babuínos como modelo animal, se implantó una pieza de Ti6Al4V en el fémur de los babuínos, fijada con tornillos de acero inoxidable. Tras tres años de implantación, el nivel de titanio en el suero fisiológico era similar al del grupo control, aunque el nivel en orina presentaba un incremento en un factor seis. También se observaron incrementos significativos en la concentración de titanio y vanadio en los tejidos pulmonares, así como un incremento en la concentración de iones de aluminio en los músculos cercanos al implante, pulmones y regiones linfáticas. Esto no implica necesariamente que el Ti6Al4V produzca una elevada liberación de iones, debido a la presencia de las piezas de acero inoxidable, que pueden generar corrosión galvánica, y la posible existencia de desgaste puntual en los implantes [Woo84].

En otro estudio diseñado para estudiar el efecto del área efectiva del implante de Ti6Al4V en la liberación de iones, un grupo de conejos fueron implantados con muestras densas y otro con muestras porosas de Ti6Al4V [Lug91]. Tras dos años, se midió contenido de titanio en diversos tejidos. No se observaron diferencias entre los dos grupos, aunque la falta de grupo control dificulta extraer conclusiones.

Todos los estudios anteriores se basaban en el estudio de la liberación de iones desde un implante. Para soslayar la variable no controlada de la velocidad de liberación de iones en la distribución y eliminación de iones metálicos, fueron inyectadas diferentes concentraciones de sales de titanio y de vanadio en hámsters a fin de

simular los iones resultantes de procesos de degradación [Mer96]. Se midieron las concentraciones en orina, sangre, y al final del estudio (cuatro meses), en diferentes tejidos. Los resultados indicaron que el vanadio es difícilmente absorbido por los tejidos y es excretado rápidamente del organismo, aunque a altas dosis de sales se pudo medir un incremento de la concentración en hígado y bazo, probablemente debido a la función filtrante y al gran volumen de sangre, respectivamente. En cuanto al titanio, se midieron ligeros incrementos en la concentración de iones en los tejidos próximos al punto de inyección. Estos resultados indican que el titanio se acumula localmente. Sin embargo, el nivel de concentración de sales necesario para iniciar la acumulación de iones en los tejidos era tan elevada, que el equivalente en cuerpo humano equivaldría a una pérdida de 7,5 g en la prótesis o implante, por lo que difícilmente es trasladable a la experiencia clínica.

Las diferencias descritas entre los resultados de los diferentes estudios realizados sobre la liberación de iones del Ti6Al4V en modelos animales pueden ser debidas a los diferentes protocolos usados, los diferentes puntos de implantación, e incluso los diferentes objetivos de los estudios. Además, en varios casos la información relativa a la metodología era prácticamente inexistente.

Un estudio realizado en pacientes implantados con prótesis modulares de cadera (CoCr-titanio cp) mostró un modesto incremento en los niveles de iones titanio en sangre tras tres años de implantación, probablemente debido a micromovimientos y desgaste en las prótesis [Jac96]. En todos los casos, la funcionalidad de la prótesis era correcta, y no se observaron efectos tóxicos en los pacientes. Por el contrario, en otro seguimiento de pacientes con prótesis de cadera de Ti6Al4V, en este caso con problemas de aflojamiento, se observó un claro incremento en la concentración de iones Ti, Al y V en el tejido capsular y de titanio y vanadio en el fluido sinovial [Dor90]. En sangre, sólo se observó un incremento en la concentración de titanio. Estos resultados sugieren que las partículas de desgaste son la causa del incremento en la concentración local de iones.

6.1.1.3 Justificación de los estudios realizados

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que la liberación de iones titanio tan sólo afecta al tejido que se halla en las cercanías del implante, mientras que los iones aluminio y vanadio son rápidamente excretados del organismo. Los estudios mediante modelos animales, si bien presentan ciertas contradicciones, sugieren que la acumulación sistémica de los iones titanio, aluminio y vanadio es muy reducida, y que su acumulación sólo se produce cuando las cantidades presentes de iones metálicos son realmente elevadas.

Sin embargo, los diferentes protocolos seguidos, así como los diferentes objetivos de los estudios, hacen

difícil aplicar los resultados al caso tratado. En concreto, no se han realizado estudios de la liberación de iones de implantes de Ti6Al4V nitrurados. Si bien la FDA (*Federal Drug Administration*) ha aceptado el uso de los nitruros de titanio para recubrimientos de implantes de titanio y Ti6Al4V [Pap95], no se han realizado estudios sobre el efecto de la capa de nitruros de titanio en la liberación de iones del Ti6Al4V. Es por ello que se ha considerado necesario realizar un estudio relativo al Ti6Al4V nitrurado, para comprobar si la capa superficial actúa como barrera para la liberación de iones de titanio, o por el contrario acelera su liberación. Dados los datos existentes relativos a la rápida excreción de iones vanadio y aluminio, se redujo el estudio a la concentración de iones titanio en los tejidos.

6.1.2 Estudios histológicos

6.1.2.1 Efecto de prótesis e implantes en la histología de los tejidos

El acero inoxidable AISI 316L y las aleaciones de CoCr fueron las primeras aleaciones metálicas utilizadas como biomateriales, a pesar de que frecuentemente se encontraban productos de corrosión en los tejidos cercanos al implante [Lai67]. Dichos productos de corrosión se han demostrado citotóxicos *in vitro*, y sin embargo su aplicación *in vivo* no parece generar problemas de citotoxicidad. Sin embargo, la inquietud sobre los efectos a largo plazo de los productos de corrosión de aceros y aleaciones CoCr llevó al uso del titanio y su aleación Ti6Al4V como biomateriales, debido a su excelente resistencia a la corrosión.

Tras varios años de uso del Ti6Al4V como material para la fabricación de prótesis, se comenzaron a observar algunos casos de aflojamiento aséptico de la prótesis. Tras varios estudios se constató que en la mayoría de casos el aflojamiento era causado por una reacción a cuerpo extraño en los histocitos causada por partículas de UHMWPE. Tras este descubrimiento, se comprobó que la reacción del organismo a un biomaterial no dependía sólo del tipo de material, sino también del tamaño de las partículas generadas, del área y de su morfología [Kub99]. Este efecto producido por las partículas producidas por el desgaste ha llevado a estudiar tratamientos de endurecimiento superficial de las aleaciones hasta ahora utilizadas.

Ahora bien, las interacciones metal-tejido biológico dependen del estado de la superficie del metal. Esto es, de los tratamientos superficiales aplicados, de sus propiedades físico-químicas de su rugosidad, de los iones liberados, etc. A pesar de ello, se han realizado pocos estudios biológicos sobre el efecto de los tratamientos superficiales en la biocompatibilidad del titanio y sus aleaciones.

6.1.2.2 Estudios realizados *in vitro*

Todos los estudios de biocompatibilidad del titanio cp y del Ti6Al4V realizados *in vitro* han demostrado la excelente biocompatibilidad de estos materiales. Por ejemplo, en un estudio reciente se estudió la respuesta *in vitro* de cultivos osteoblásticos de rata a muestras de titanio cp y Ti6Al4V [Kel96]. Los resultados mostraron que tanto el titanio cp como el Ti6Al4V con biocompatibles, y que las pequeñas diferencias en la estructura del óxido entre el titanio y el Ti6Al4V no afectan a los cultivos osteoblásticos.

Sin embargo, el número de estudios realizados sobre la biocompatibilidad de los tratamientos superficiales es muy reducido. En un estudio de 1991 se demostró la biocompatibilidad de los recubrimientos de TiN realizados por PAPVD sobre diversos materiales de uso odontológico en cultivos de células epiteliales [Beh91]. El conteo de células de los cultivos mostró resultados similares para las muestras tratadas y para las muestras no tratadas, usadas como controles.

Otros estudios de la biocompatibilidad *in vitro* de muestras de titanio y Ti6Al4V nitruradas mediante PVD e implantación iónica en cultivo de fibroblastos no mostraron diferencias apreciables entre el grupo control, los cultivos con Ti cp y Ti6Al4V y los cultivos con muestras nitruradas [Bra93, Bor96]. El estudio de la morfología tampoco mostró diferencias apreciables, ya que las células presentaban en todos los casos una apariencia regular. La vitalidad de los cultivos tampoco mostraron diferencias entre las diferentes muestras estudiadas. Sólo se observó una disminución en la proliferación celular en los materiales nitrurados, quizás debida a la mayor rugosidad en los materiales nitrurados, lo que podría dificultar la adhesión y proliferación de las células del cultivo [Bor96].

En los trabajos citados, los resultados indican que las capas de nitruros superficiales no tienen influencia negativa en los cultivos celulares. En conjunto, los resultados parecen demostrar la buena biocompatibilidad de los tratamientos de nitruración estudiados *in vitro*.

6.1.2.3 Estudios realizados *in vivo*

El número de estudios *in vivo* relativos a los efectos histológicos de los materiales implantados aún es menor que los realizados *in vitro*. Además, la mayoría de dichos estudios se han centrado en la relación entre el desgaste y los aflojamientos asépticos de prótesis e implantes.

Se han estudiado los efectos de prótesis totales de cadera de Ti6Al4V y aleación de CoCr con acetábulo de UHMWPE [Dor90]. En estos trabajos se realizaron estudios histológicos de la cápsula fibrosa y la membrana que envolvía la prótesis, en busca de partículas metálicas y de polietileno, células gigantes o macrófa-

gos, así como evidencia de osteolisis. Los análisis practicados mostraron la existencia de partículas metálicas en la cápsula fibrosa, con mayor presencia en el caso de las prótesis de CoCr. También se apreció la existencia de partículas de polietileno. En los casos en que la prótesis estaba aflojada, la cantidad de partículas presente se multiplicaba por un factor 50, con un incremento de la cantidad de iones metálicos presente. Respecto a las células presentes, se comprobó la existencia de células gigantes multinucleadas y de histocitos en los tejidos circundantes en cantidades importantes, generalmente con partículas vacuolizadas. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otro trabajo en el que se relacionan la existencia de partículas metálicas y de polietileno con la aparición de células gigantes, indicadoras de una respuesta inmunológica por parte del tejido [Mir82]. Estos resultados relacionan la formación de partículas de desgaste y el incremento en la concentración de iones metálicos con la aparición de células gigantes y de histocitos y con el aflojamiento de las prótesis.

Un estudio relativo al seguimiento implantes dentales de titanio cp aflojados confirmaron la relación entre aflojamiento y presencia de partículas de desgaste. Se observó que los implantes estaban envueltos en tejido conectivo donde se pudieron observar fibroblastos, células plasmáticas y linfocitos, en lugar de la formación ósea típica de la oseointegración. También se observó la presencia de células multinucleadas gigantes, con vacuolización de partículas, generalmente de hierro, probablemente provenientes de contaminación del implante [Ary98].

En otro estudio se implantaron cien superestructuras odontológicas de CrCoMo recubierto de TiN [Beh91]. Tras dos años y medio, la funcionalidad y fijación de las prótesis no se había modificado, la capa no se había desgastado y no se observaron efectos nocivos.

Los resultados anteriores han sido confirmados y complementados con otros estudios, que han mostrado que las reacciones a cuerpo extraño y la osteolisis del hueso están más relacionadas con la presencia y tamaño de las partículas de desgaste que con el tipo de material usado o con la liberación de iones [Kub99]. En general, todos los materiales usados en prótesis son capaces de generar fuertes reacciones inmunológicas en los tejidos circundantes a partir de la generación de partículas de desgaste de un tamaño dado, que pueden provocar aflojamiento aséptico de la prótesis.

6.1.2.4 Justificación de los estudios realizados

Como se puede comprobar, no hay estudios realizados *in vivo* relativos al efecto de tratamientos superficiales de nitruración en la histología de los tejidos. Dado que este es un aspecto básico del estudio de todo biomaterial, y dada la posibilidad de combinar este estudio

con el análisis de la liberación de iones de los materiales estudiados, se decidió realizar un estudio histológico en modelo animal del efecto del tratamiento termoquímico de nitruración de la aleación Ti6Al4V en la liberación de iones, y relacionar los resultados histológicos con los datos obtenidos de las concentraciones sistémicas de iones de titanio en los tejidos.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Materiales

El material estudiado fue la aleación Ti6Al4V. Se usó material proveniente del mismo lote para todos los ensayos. La aleación Ti6Al4V se recibió en barra de 12,7 mm de diámetro, con la composición indicada en la tabla 2.1. La microestructura, la composición química y las microestructuras son las indicadas en el apartado 2.2.1, y se ajustan a la norma F136 para su aplicación en implantes quirúrgicos.

La barra de 12,7 mm se mecanizó hasta obtener un cilindro de 10 mm. de diámetro. A partir de dicho cilindro se cortaron 18 muestras cilíndricas de 10 mm de diámetro y 1 mm de espesor con una cortadora de diamante Isomet.

Las probetas obtenidas fueron pulidas y limpiadas según el protocolo indicado en el apartado 2.2.1. Las probetas así preparadas fueron nitruradas según el tratamiento termoquímico de nitruración indicado en el apartado 2.2.2.3, a una temperatura de 900°C durante una hora.

Tras los diversos tratamientos termoquímicos y de microrectificado, y antes de la implantación, las muestras fueron preparadas siguiendo las directrices establecidas por los estándares ASTM para la preparación de implantes quirúrgicos [AST94].

6.2.2 Diseño de experimentos

Las muestras fueron separadas en tres grupos de seis muestras cada una. El primer grupo de muestras fueron nitruradas, el segundo grupo de muestras también fueron nitruradas, pero se les aplicó un ligero pulido, y en el tercero se usaron las muestras preparadas sin nitrurar. En las muestras a las que se les aplicó un pulido tras el tratamiento, éste afectó a un espesor de 1-4 μm de la muestra. Se comprobó el resultado mediante difracción de rayos X de muestras seleccionadas según el procedimiento indicado en el apartado 3.2.3.6.3.

En cada grupo de animales, tres animales recibieron un implante durante un mes y los otros tres animales recibieron el implante durante cuatro meses. Los datos de control se obtuvieron del grupo de tres ratas que no recibieron un implante. Ninguno de los animales murió o presentó síntomas de enfermedad durante el experimento.

6.2.3 Modelo animal

Se prepararon 21 ratas macho Wistar para recibir la implantación. Los animales estaban sanos en recepción, con un peso entre 125–150 g. El valor medio de la ratio área del implante por peso del animal era aproximadamente 12 veces mayor que la ratio que experimentaría una persona con una prótesis cementada de cadera. Las ratas se dividieron en cuatro grupos, un grupo de tres animales que sirvieron como control, y tres grupos de seis animales. Cada grupo de animales recibió un tipo de implante distinto. Las directrices del *National Institute of Health* americano (NIH) para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio fueron seguidas estrictamente durante todo el experimento [NIH85].

6.2.4 Protocolo de implantación y extracción

La implantación y recuperación de las muestras fueron realizadas en una sala de operaciones especialmente habilitada para la cirugía experimental con animales. Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano vaporizado en un 5% en un flujo de oxígeno de 2 l·min⁻¹, tanto para la implantación como para la recuperación de la muestra. Para asegurar que los animales respiraban la anestesia fueron conectados al circuito mediante una máscara de Hall modificada. Una vez anestesiados, se les practicó una incisión en el tercio inferior de la región paravertebral izquierda en condiciones de asepsia. Las fibras del músculo fueron separadas a fin de implantar la muestra en el interior del músculo. La migración de la muestra fue evitada cerrando la fascia con un punto de sutura no reabsorbible.

Transcurrido el periodo marcado de implantación, los animales fueron eutanasiados. Durante la necropsia se volvió a abrir la incisión paravertebral inicial y se recuperó el biomaterial con el tejido muscular circundante. Con una incisión simétrica en el otro lado de la columna vertebral se obtuvo una muestra del músculo paravertebral contralateral. A continuación se tomaron muestra de tejidos del bazo, músculo paravertebral y contralateral, riñón, pulmón, hígado y hueso mediante laparatomía y esternotomía, y por craneotomía se extrajo el cerebro del animal.

Todas las muestras de órganos y tejidos fueron pesadas en fresco en el momento de la extracción, con los resultados mostrados en la tabla 6.1. Los órganos se dividieron en dos partes. Una se fijó en formol al 10% para la realización del estudio histológico y la segunda fue congelada en nitrógeno líquido a -80°C y conservada para la determinación del contenido tisular de los diferentes iones metálicos.

Tabla 6.1 Peso de los órganos extraídos.

Organo	peso ± desviación estándar [g]					
	material 1		material 2		material 3	
	30 días	100 días	30 días	100 días	30 días	100 días
Hígado	9,99 ± 1,37	13,22 ± 1,42	11,18 ± 1,70	15,61 ± 0,47	12,16 ± 0,62	13,52 ± 1,95
Pulmón	1,70 ± 0,07	2,22 ± 0,25	2,00 ± 0,14	2,14 ± 0,36	1,84 ± 0,17	2,45 ± 0,08
Bazo	0,79 ± 0,14	1,02 ± 0,19	1,07 ± 0,07	1,00 ± 0,06	1,09 ± 0,12	0,99 ± 0,07
Riñón	1,95 ± 0,27	2,72 ± 0,15	2,36 ± 0,27	3,00 ± 0,21	2,31 ± 0,23	2,77 ± 0,37
Hueso	0,83 ± 0,12	0,88 ± 0,08	0,86 ± 0,07	0,94 ± 0,07	0,62 ± 0,08	1,12 ± 0,18
Cerebro	1,96 ± 0,15	1,99 ± 0,03	2,11 ± 0,18	1,91 ± 0,03	2,02 ± 0,03	2,03 ± 0,02
Músculo	0,83 ± 0,24	0,89 ± 0,14	1,31 ± 0,17	0,90 ± 0,21	1,09 ± 0,08	1,23 ± 0,30
Musc. contralateral	— ^a	0,98 ± 0,13	— ^a	0,76 ± 0,08	— ^a	0,82 ± 0,10

^a Valor no medido.

6.2.5 Liberación de iones

Los niveles de titanio en los tejidos analizados fueron determinados mediante espectroscopia de masas ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*).

Para la realización de los análisis, se descongelaron las muestras obtenidas de los diferentes órganos y se pesaron. A fin de obtener una solución líquida homogénea, necesaria para realizar las medidas, se digirieron los tejidos mediante microondas. A partir de esta solución se tomó un volumen conocido para realizar los análisis, lo que permitió determinar la concentración másica de iones en los diferentes tejidos.

6.2.6 Estudios histológicos

En paralelo con los análisis de liberación de iones, se procedió a realizar un estudio histológico de tejidos del pulmón, riñón, bazo e hígado de los grupos control e implantados. Para la realización de los estudios histológicos, las muestras han de ser sometidas a una serie de pasos:

1. Deshidratación de la muestra: se prepararon secciones de los diferentes órganos a estudiar y se fijaron en fijador Bouin. El material no utilizado se volvió a congelar para posteriores análisis. Para proceder a una deshidratación gradual, el bloque preparado se sumergió secuencialmente en los siguientes medios:
 - alcohol 96°: 30 minutos
 - alcohol 96°: 30 minutos
 - alcohol 96°: 30 minutos
 - alcohol 100°: 30 minutos
 - alcohol 100°: 30 minutos
 - alcohol 100°: 30 minutos
 - xilol: 15 minutos
 - parafina: 20 minutos
 - parafina: 20 minutos
 - parafina: 20 minutos
2. Una vez deshidratada y parafinada, se procedió a englobar la muestra en un bloque de parafina. A partir de este bloque se cortaron secciones de tejido de 7-8 μm de espesor con un microtomo.

Tras preparar cinco o seis cortes, éstos se introducen en un baño de agua a 50°C, para facilitar el estiramiento de los cortes y evitar posibles alteraciones. Una vez realizado el baño, los cortes histológicos son depositados en portamuestras impregnados en una solución de albúmina-globulina al 50%. Una vez depositados, los portamuestras se dejan durante 24 horas en una estufa a 37°C para que se sequen las muestras, se coagulen y queden adheridas.

3. La tinción de los cortes histológicos se realizó en tres cortes, guardando el resto como reserva. El proceso de tinción requiere realizar diferentes baños, necesarios para desparafinar los portaobjetos, deshidratarlos y teñir las muestras:
 - xilol: 15 minutos
 - alcohol 100°: 15 minutos
 - alcohol 96°: 5 minutos
 - agua: 5 minutos
 - hemalumbre (tinte): 10 minutos
 - agua: 10 minutos (enjuague del colorante)
 - picrocarmin de índigo: 2 minutos (colorante)
 - agua: lavado rápido (enjuague del colorante)
 - alcohol 96°: 30 segundos
 - alcohol 100°: 1 minuto
 - xilol: durante el resto del montaje
4. Una vez realizada la tinción, sólo queda aplicar una gota de resina del Canadá a la muestra, cubrirla con un cubreobjetos y dejar secar.
5. Las muestras obtenidas se compararon con relación a las muestras de las ratas del grupo control, a fin de comparar la morfología e histología general de las células. Se buscaron modificaciones causadas por efectos toxicológicos provocados por los iones metálicos liberados.

Tabla 6.2 Concentración de iones titanio en los diferentes tejidos estudiados.

	Concentración ng/ml (n=3)													
	pulmón		músculo paravertebral ^(a)		músculo contralateral		riñón		bazo		cerebro		hígado	
	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120
Ti6Al4V no tratado	857±21	895±19	1860±200	887±8	-(b)	1130±107	892±30	913±29	1356±26	1370±28	989±24	724±22	1021±41	891±14
Ti6Al4V tratado	812±25	801±21	767±38	987±60	-(b)	1079±70	887±20	863±44	1370±40	1381±38	1012±21	699±27	1018±41	805±32
Ti6Al4V tratado y pulido	879±23	888±23	921±56	1125±95	-(b)	1035±85	963±17	899±51	1353±18	1316±63	1055±21	737±27	1036±30	937±39
Control	740±54	740±54	1060±142	1060±142	1060±142	1060±142	882±54	882±54	1659±170	1659±170	790±76	790±76	850±30	850±30

^(a) Músculo próximo al implante

^(b) Resultados descartados debido a problemas de preparación

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Liberación de iones

Los análisis de la concentración de iones de titanio en las diferentes muestras estudiadas se muestra en la tabla 6.2.

En el bazo, la concentración de iones disminuyó con el tiempo de implantación, como se muestra en la figura 6.1. Por el contrario, en hígado (figura 6.2) y cerebro (figura 6.3), la concentración se incrementa ligeramente tras 30 días de implantación, y volvió a los valores de salida a los 120 días.

En el riñón (figura 6.4) y en el músculo contralateral (figura 6.5), la concentración de iones titanio se mantiene estable.

En el músculo alrededor del implante, no hay diferencias significativas, excepto para la muestra no tratada, en la que se midió un gran incremento en la concentración tras 30 días de implantación, como se muestra en la figura 6.6.

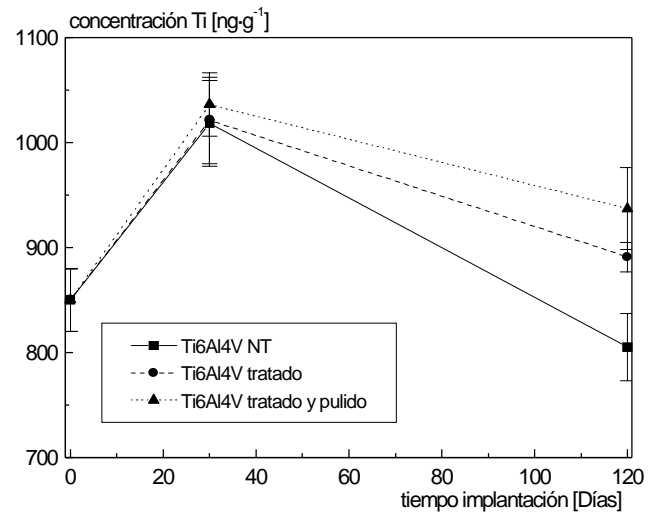


Figura 6.2 Concentración de iones titanio en el hígado.

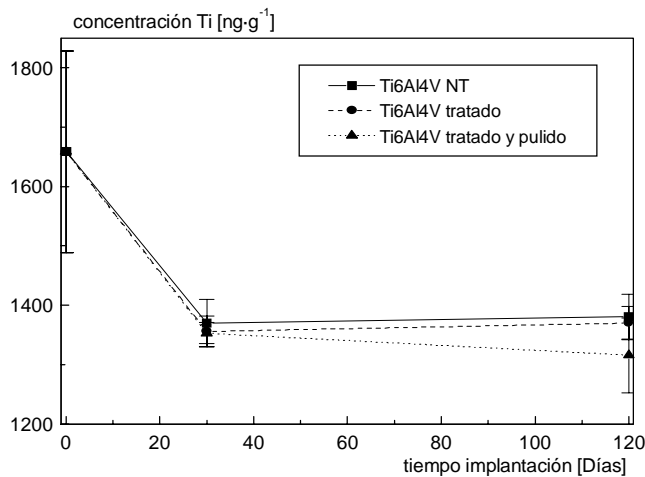


Figura 6.1 Concentración de iones titanio en el bazo.

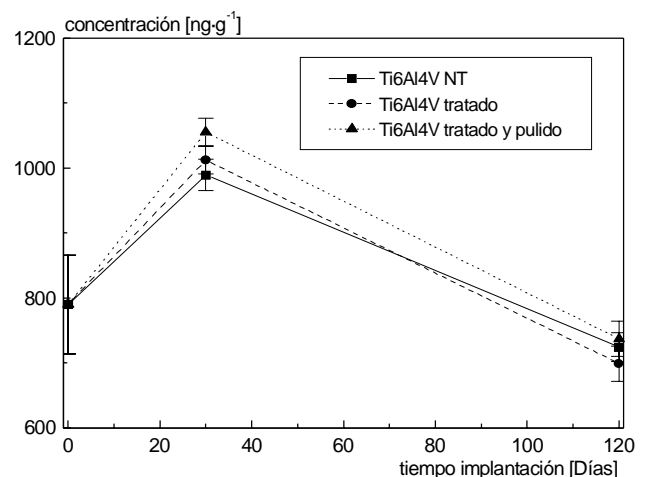


Figura 6.3 Concentración de iones titanio en el cerebro.

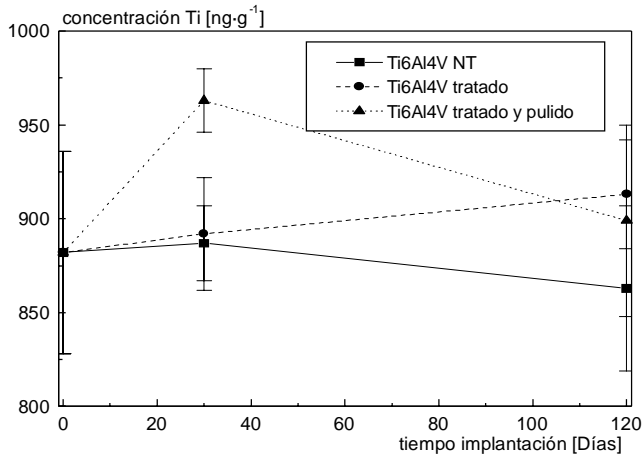


Figura 6.4 Concentración de iones titanio en el riñón.

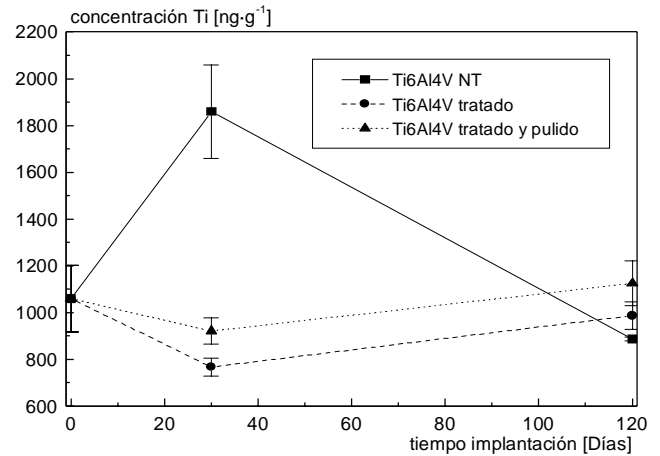


Figura 6.6 Concentración de iones titanio en el músculo cercano.

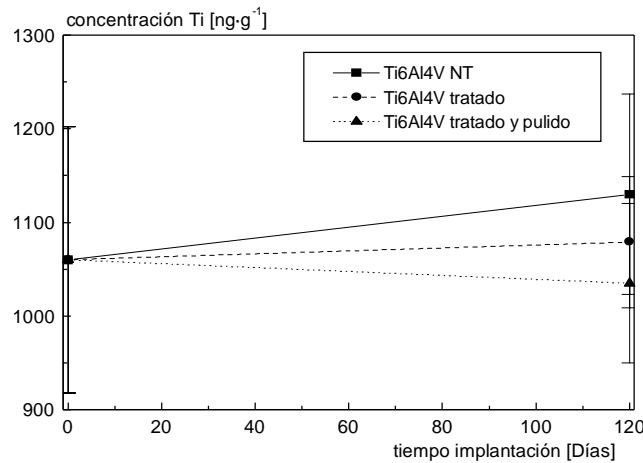


Figura 6.5 Concentración de iones titanio en el músculo contralateral.

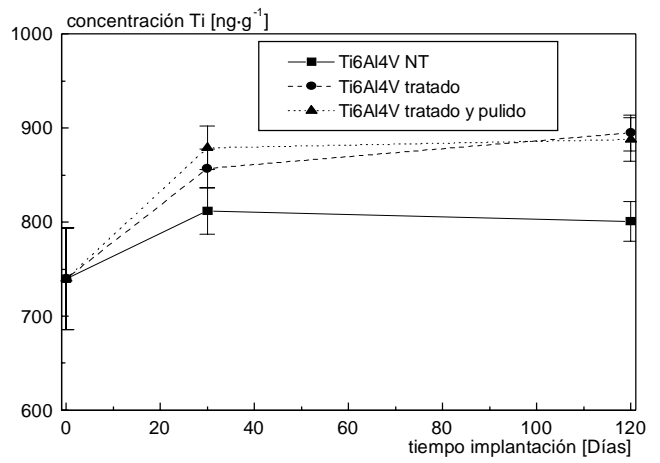


Figura 6.7 Concentración de iones titanio en el pulmón.

En el pulmón, se detectó un ligero incremento de la concentración de titanio con el tiempo de implantación, si bien no fue estadísticamente significativo (figura 6.7).

6.3.2 Estudios histológicos

Una primera observación de todas las muestras preparadas mostró algunas diferencias de tinción, las cuales no son importantes pero pueden dificultar las comparaciones. Lo que sí se pudo comprobar es la presencia de una cápsula fibrosa en todos los implantes retirados. Esta cápsula puede servir como barrera a la difusión de los iones liberados por el implante. En general, no se han observado diferencias significativas en la morfología tisular entre las secciones extraídas de ratas implantadas con diferentes tipos de implante. Sin

embargo, se han observado algunas diferencias cuando se han comparado con secciones extraídas de los grupos control.

6.3.2.1 Pulmón

Un punto a tener en cuenta al estudiar la histología del tejido pulmonar es que existen diferencias significativas en la citología, según si la preparación se realiza por la una sección proximal o bien distal del pulmón, indicadas en la figura 6.8.

Una de las secciones estudiadas en los tejidos obtenidos de ratas del grupo control presentaba una zona de bronquios grandes, en los que se observaron acúmulos linfoides al lado del alvéolo (figura 6.9). Las di-

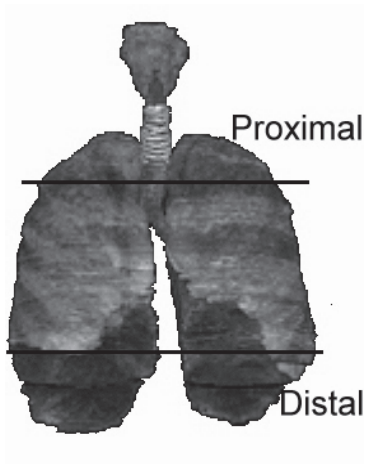


Figura 6.8 Vista general del pulmón. Secciones proximal y distal.

ferencias respecto a la sección control de tejido (figura 6.10) pueden ser debidas a los diferentes planos de corte preparados, dando lugar a la observación de diferentes zonas del tejido pulmonar.

En alguna sección de tejido preparada a partir de animales implantados se observó la existencia de una posible fibrosis en el tejido observado (figura 6.11), aunque el efecto observado también pudo ser debido a que el tejido está más tenso. Como esto puede ser causado por la fijación de la muestra, no está claro que se trate de una patología. Lo que sí que parece confirmado es una mayor presencia de acúmulos linfoides (figura 6.12).

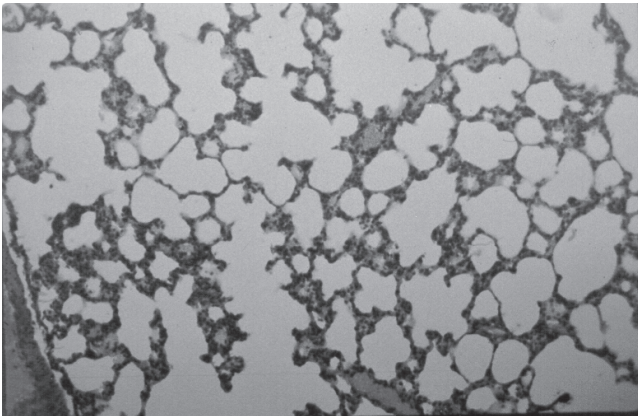


Figura 6.9 Ti6Al4V no tratado. Tejido pulmonar. Zona alveolar (10x).

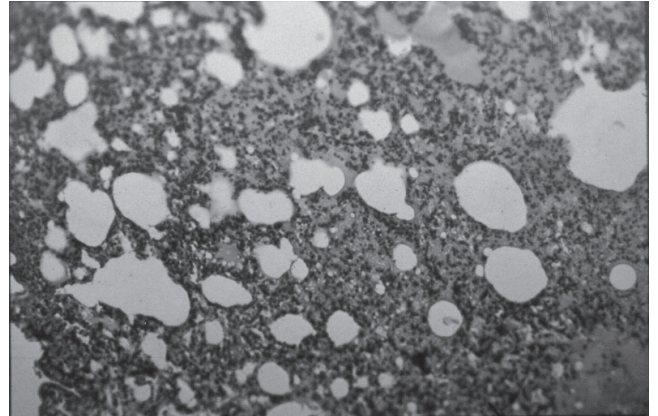


Figura 6.11 Ti6Al4V tratado y pulido. Tejido pulmonar. Parénquima un poco engrosado (20x).

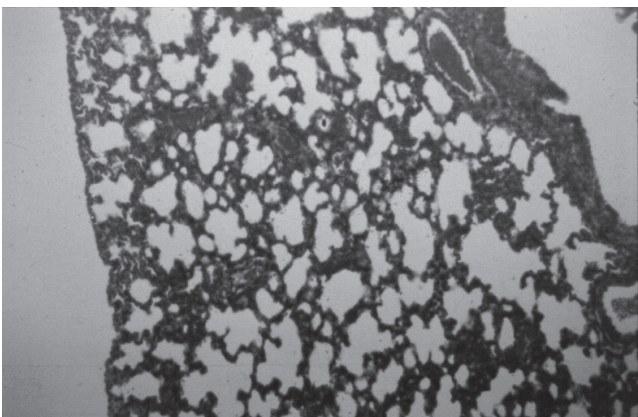


Figura 6.10 Grupo control. Tejido pulmonar. Zona alveolar (10x).

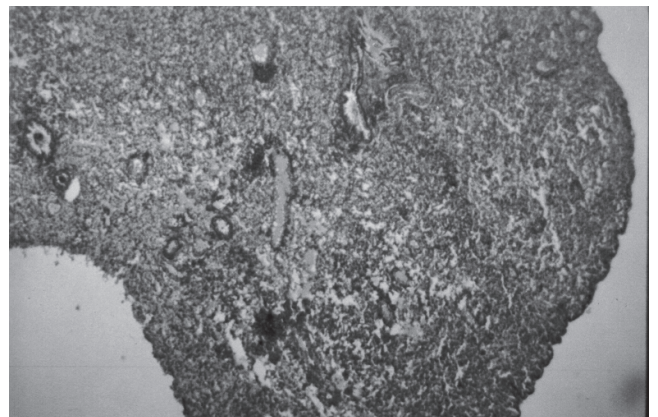


Figura 6.12 Ti6Al4V tratado. Tejido pulmonar. Acúmulos linfoides (20x).

6.3.2.2 Riñón

En la figura 6.13 se observa una región de la zona limítrofe de los microtúbulos urinarios en una muestra control.

Si se compara el tejido control con una sección extraída de un animal implantado, se observa un incremento del área blanca en los microtúbulos, aunque puede ser un efecto de la preparación (figura 6.14). No se ha observado ninguna otra diferencia apreciable entre tejidos extraídos del grupo control y el extraído de animales implantados.

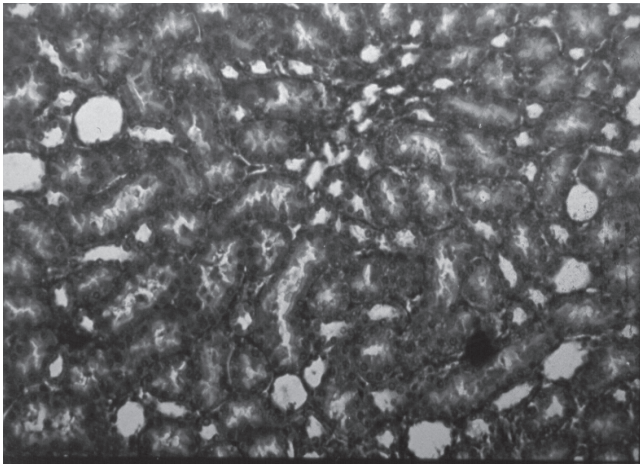


Figura 6.13 Grupo control. Tejido del riñón. Corteza interna, túbulo contorneado (20x).

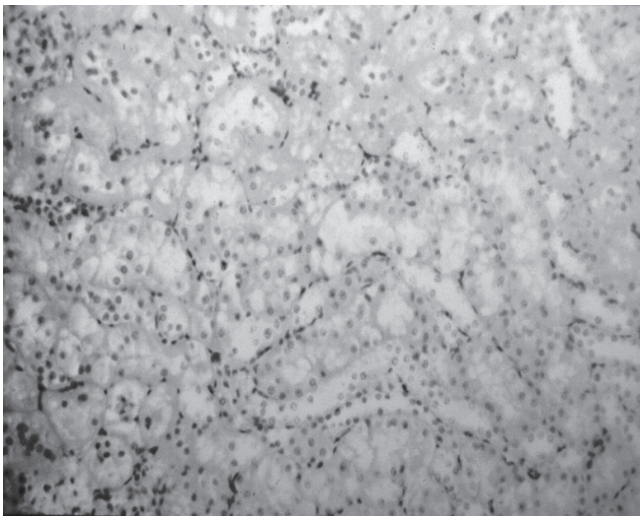


Figura 6.14 Ti6Al4V tratado. Tejido del riñón. Corteza interna, túbulo contorneado (20x).

6.3.2.3 Bazo

A nivel de tejidos linfoides aparecieron algunas diferencias entre las muestras extraídas a los tres grupos implantados y las muestras control. En la figura 6.15 se muestra la pulpa blanca y la pulpa roja de una sección de bazo extraída de uno de los animales del grupo control. En la pulpa roja se generan los linfocitos T, y en la pulpa blanca se producen las células B y los macrófagos. Es necesario señalar que en la pulpa roja no se observan grupos de células.

Sin embargo, en algunas secciones extraídas de ratas implantadas con Ti6Al4V no tratado aparecen grupos de células en la pulpa roja (figura 6.16). A más aumentos (figura 6.17), se observa que los grupos están muy teñidos, y que posiblemente sean células plas-

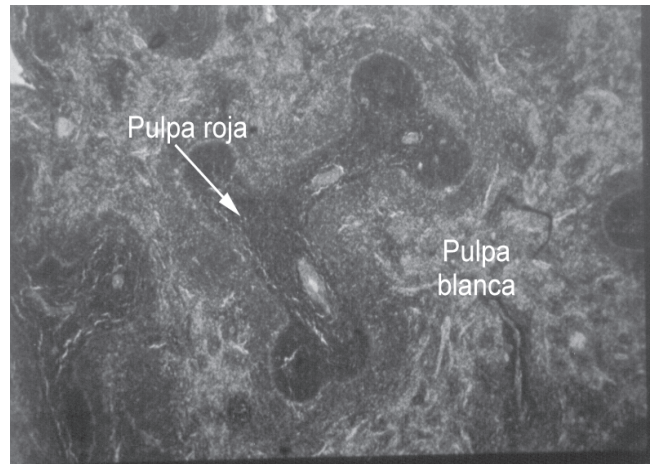


Figura 6.15 Grupo control. Tejido del bazo. Pulpa blanca y pulpa roja (5x).

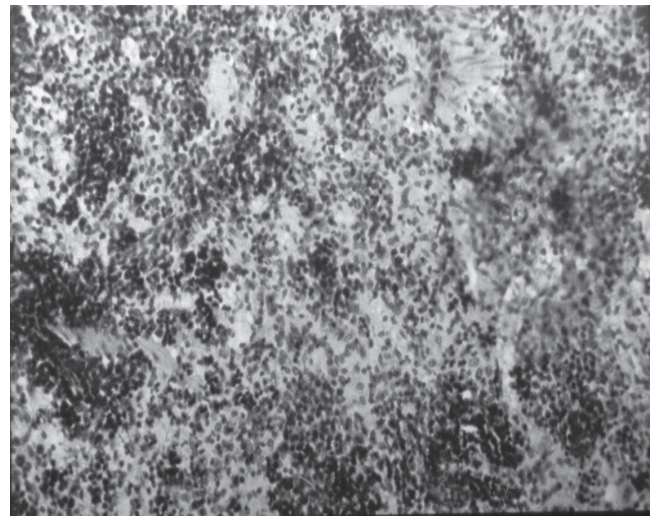


Figura 6.16 Grupo control. Tejido del bazo. Pulpa roja. Grupos de células (20x).

máticas productoras de anticuerpos. Estas existen en condiciones normales, pero no tan numerosas y agrupadas.

En otra sección (figura 6.18) se observaron blastos (células productoras de anticuerpos) que normalmente se encuentran en la pulpa roja, pero no en acúmulos.

En general, esta presencia observada de agrupaciones de células es inespecífica del material, ya que también se ha observado tanto en animales implantados con Ti6Al4V no tratado como en animales implantados con Ti6Al4V nitrurado.

6.3.2.4 Hígado

El hígado es el tejido en el que se observaron más cambios en relación con las preparaciones extraídas del grupo control. Con todos los materiales se observa una cierta gradación en función de la zona del órgano de la cual se han tomado las muestras. En las figuras 6.19 y 6.20 se muestra el tejido conjuntivo de secciones control, con los hepatocitos claramente resueltos.

En la figura 6.21 se observa el primer tipo de degeneración observada en tejidos hepáticos de animales implantados con Ti6Al4V no tratado. Se observa en la sección la existencia de una degeneración del parénquima hepático la cual parece ser debida a la degeneración de algunas células combinado con una cierta vacuolización. Esto podría ser un signo de lipidosis, patología por la cual el hígado se llena de lípidos. Cabe indicar, sin embargo, que esta observación no parece ser debida a un artefacto.

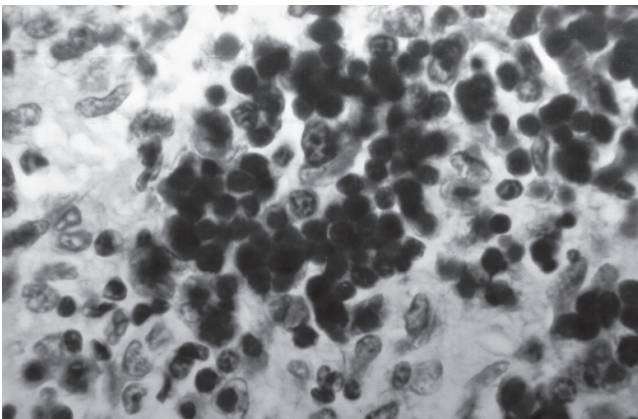


Figura 6.17 Grupo control. Tejido del bazo. Pulpa roja. Grupos de células (100x).

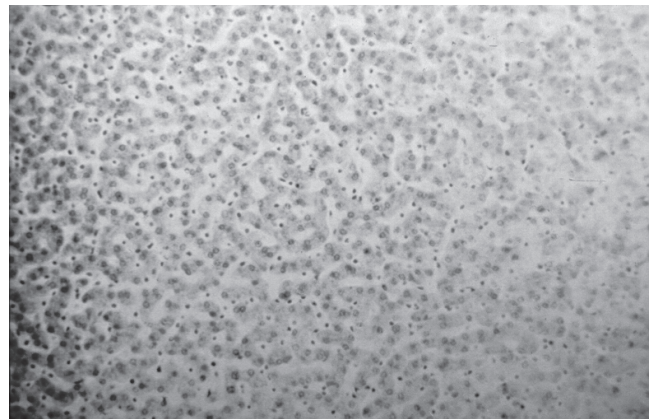


Figura 6.19 Grupo control. Tejido hepático. Hepatocitos (20x).

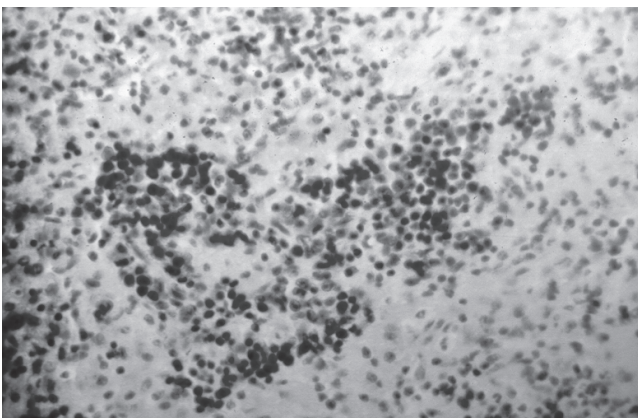


Figura 6.18 Ti6Al4V tratado. Tejido del bazo. Grupos de blastos (40x).

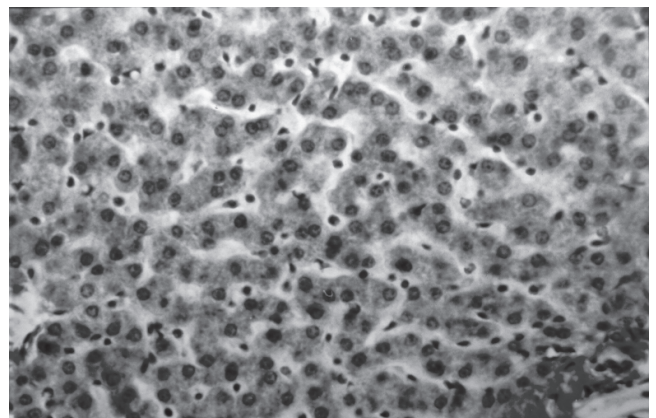


Figura 6.20 Grupo control. Tejido hepático. Hepatocitos (40x).

En la figura 6.22 se aprecia en segundo tipo de degeneración observado, en este caso en un animal implantado con una muestra de Ti6Al4V nitrurada. Se observaron células pálidas en el entorno del núcleo. Puede ser que este sea el primer estadio de la degeneración antes observada. También podría ser el estado final de una vacuolización de ciertas células (un 20% aproximadamente). En la figura 6.23 se observa un detalle de lo anterior. Sería necesario realizar un estudio cuantitativo del glucógeno presente y de otros parámetros para precisar si se trata verdaderamente de una patología, y de qué tipo se trata.

En la figura 6.24 se aprecia, a más aumentos, vacuolización, la cual podría conducir a una mayor degeneración. Lo que se observó, sin embargo, es una

vacuolización en el sentido morfológico. Sería necesario comprobar con microscopía electrónica si es una vacuola o un signo de degeneración. Por otro lado, no aparecieron inclusiones ni depósitos, habituales en diferentes patologías.

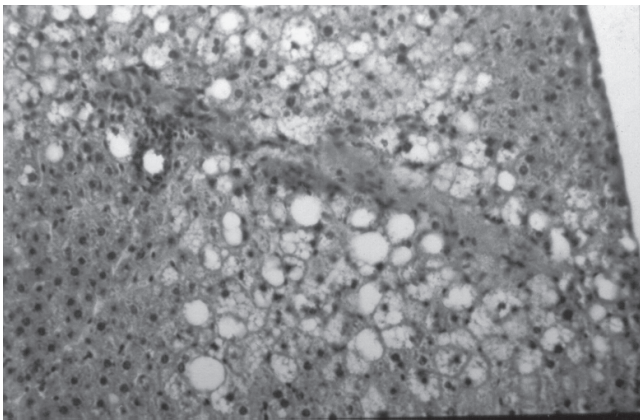


Figura 6.21 Ti6Al4V no tratado. Tejido hepático. Zona degenerada (20x).

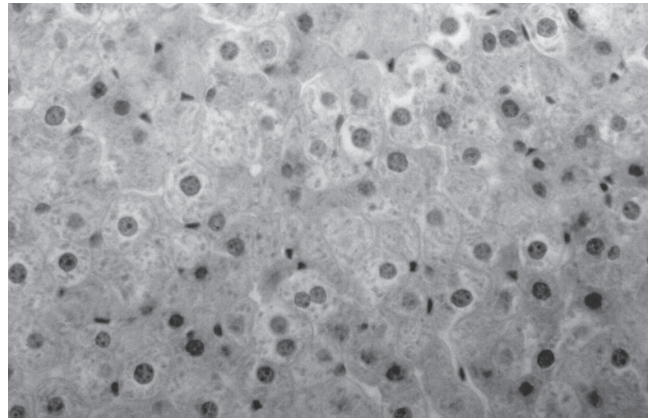


Figura 6.23 Ti6Al4V tratado. Tejido hepático. Células con degeneración (20x).

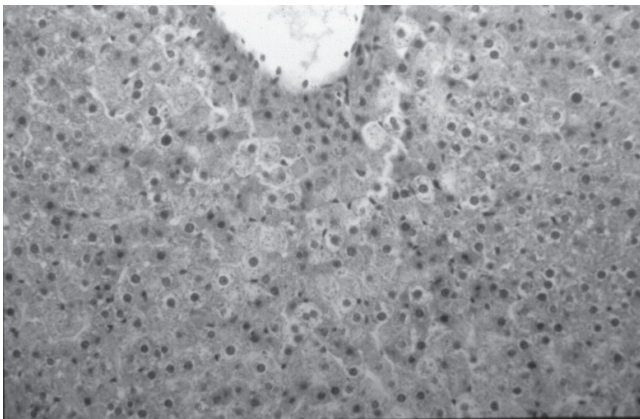


Figura 6.22 Ti6Al4V tratado. Tejido hepático. Células con degeneración (10x).

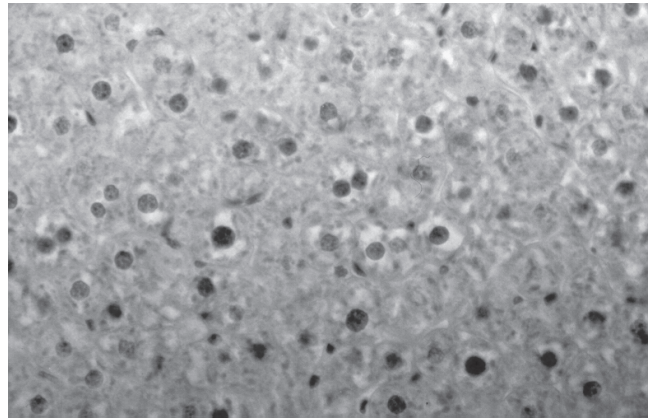


Figura 6.24 Ti6Al4V tratado y pulido. Tejido hepático. Células con degeneración (40x).

6.4 DISCUSIÓN

6.4.1 Liberación de iones

Se realizó un estudio estadístico comparando los valores obtenidos con los proporcionados por las muestras control mediante la distribución *t-Student*. La mayoría de los resultados se hallan dentro de la variabilidad estadística experimental, tal y como se muestra en la tabla 6.3, en donde se han marcado en negrita los valores que muestran la existencia de diferencias estadísticas entre los valores control y los medidos.

Se han observado algunos resultados interesantes, como la elevación de la concentración de titanio a un mes en el tejido cerebral e hígado en todas las muestras, que a los cuatro meses vuelve a valores nominales. También son interesantes las reducciones observadas en las medidas en el bazo y los incrementos en el tejido pulmonar, relativas a los valores control. Existen trabajos que informaron de un incremento en los niveles sistémicos de titanio en el pulmón con la presencia de un implante [Woo84], si bien en este estudio no se ha observado este hecho. También se ha observado un incremento puntual a los 30 días de implantación en el músculo paravertebral (el más cercano al implante) en la muestra no tratada, a diferencia de las muestras tratadas, en las que no se aprecia este incremento local.

La ligera disminución de los niveles medidos en el bazo puede deberse a que el bazo es parte del sistema inmunológico, encargándose de retirar elementos extraños del fluido sanguíneo, y el hecho de que, en ausencia de implantes metálicos, este órgano funciona como un órgano de acumulación para iones metálicos. Ahora bien, además de estas explicaciones, es posible que estos resultados estén relacionados con el error experimental, ya que las variaciones son similares en los tres materiales estudiados, y se trata de variaciones pequeñas, que no llegan a ser significativas estadísticamente.

En general, los resultados muestran que la liberación de iones en ausencia de corrosión por parte del Ti6Al4V es muy reducida, y tiende a concentrarse de forma local sólo en el caso del Ti6Al4V no tratado. Si se comparan estos resultados con los obtenidos por otros investigadores (Tabla 6.4), se constata que los resultados son similares a los obtenidos con experimentos en los que el material no sufría ningún tipo de carga que pudiera generar desgaste o decapado de la capa de pasivación, excepto en el incremento temporal de la concentración que se produce en cerebro e hígado tras un mes de implantación, el cual puede ser debido a algún efecto del equipo experimental.

La falta de acumulación sistémica en ausencia de desgaste, por tanto, parece confirmada. Esto puede deberse a la baja solubilidad del producto liberado (hidróxido de titanio) y a su baja transportabilidad

Tabla 6.3 Comparación mediante el estadístico *t-Student*.

	Probabilidad de igualdad de medias													
	Pulmón		Músculo paravertebral		Músculo contralateral		Riñón		Bazo		Cerebro		Hígado	
	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120	30	120
Ti6Al4V no tratado	0,114	0,054	0,031	0,291	-(a)	0,714	0,879	0,639	0,153	0,169	0,005	0,125	0,028	0,283
Ti6Al4V tratado	0,292	0,352	0,117	0,660	-(a)	0,910	0,935	0,798	0,174	0,186	0,003	0,072	0,030	0,294
Ti6Al4V tratado y pulido	0,077	0,065	0,413	0,723	-(a)	0,887	0,226	0,830	0,148	0,131	0,000	0,230	0,012	0,152

(a) Resultados descartados debido a problemas de preparación

Tabla 6.4 Comparación de las ratios de concentración de titanio del grupo control con el grupo experimental para diferentes estudios.

	[Fer60]	[Woo84]	[Lug91]	[Bia97]	Ti6Al4V NT	Ti6Al4V tratado	Ti6Al4V tratado y pulido
Ratio área implante/peso [cm ² kg ⁻¹]	3,6-10,8	45-89	0,60	10	9	9	9
Número de animales	2-4	5	3	5-7	6	6	6
Tiempo implantación [meses]	1,5-4	12	24	12	1-4	1-4	1-4
Tejidos remotos							
pulmón	1,5	5,5	1	1	1,2	1,1	1,2
bazo	16	3,3	1	1	0,8	0,8	0,8
músculo	n.p. ^(a)	n.p.	n.p.	1	1	1	1
cerebro	n.p.	n.p.	1	n.p.	1,1	1,1	1,1
hígado	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	1,1	1,1	1,2
riñón	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	1	1	1
Tejido local							
músculo	24	4	n.p.	1,2	2,6	0,8	1

n.p.^(a) No publicado

metabólica [Bia97]. En contraste, los experimentos realizados en presencia de desgaste dan lugar a una elevación de los niveles sistémicos de titanio en los diferentes tejidos estudiados.

El efecto observado del tratamiento de nitruración gaseosa en la concentración sistémica de iones no es estadísticamente significativo, si bien se aprecia una considerable disminución en la cantidad de iones medidos en los tejidos más cercanos al implante en las muestras tratadas.

6.4.2 Estudios histológicos

Las observaciones realizadas de las muestras histológicas de los diferentes grupos de ratas presentan pocas diferencias entre las secciones preparadas a partir de tejidos del grupo control no implantado y las observadas provenientes de los grupos de ratas implantadas, lo que concuerda con la baja variabilidad observada en la concentración de iones metálicos. Las diferencias más significativas se han observado en las preparaciones de tejido del bazo y del hígado.

En el bazo se observó la presencia de agrupaciones de células, en lo que parece que es una reacción inespecífica a material, que no tiene por qué ser debida a toxicidad, y puede ser debida a otras causas no relacionadas con los implantes de Ti6Al4V. Parece existir una respuesta inmune del bazo, que no necesariamente ha de ser consecuencia de un efecto de toxicidad.

En el hígado se han observado señales de dos tipos diferentes de degeneración de las células hepáticas, con vacuolización de células y degeneración celular en el parénquima hepático. Estos resultados son difícilmente atribuibles a efectos de la preparación, y podrían ser debidos a algún tipo de efecto de toxicidad. Sin embargo, teniendo en cuenta que la degeneración observada se presentó en todos los grupos de ratas implantadas, incluidas las implantadas con Ti6Al4V no tratado, que el nivel medido de iones titanio en dicho órgano sólo presenta un ligero incremento temporal a los 30 días de implantación, y el hecho de que los animales no han presentado ningún signo de enfermedad durante toda la fase experimental, parecen no concordar con esta posible explicación.

Un aspecto que no ha sido posible dilucidar es la existencia de infiltrados linfoides cerca de los implantes en relación con las zonas más alejadas, a fin de comprobar la respuesta citológica reportada por otros trabajos [Ary98].

En resumen, si bien se han observado algunas diferencias cuando se han comparado los tejidos del grupo control con los tejidos extraídos de animales implantados, estas diferencias pueden ser debidas a las técnicas de preparación de los tejidos, y no causadas por la implantación realizada o por los iones liberados.

REFERENCIAS

- [Ary98] Arys A., Philippart C., Dourov N., He Y., Le Q.T., Pireaux J.J., Analysis of titanium dental implants after failure of osseointegration: combined histological, electron microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy approach, *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, **43**, 3, pp. 300-312 (1998).
- [AST94] ASTM F86, *Standard recommended practice for surface preparation and marking of metallic surgical implants*, ASTM (1994).
- [Beh91] Behrndt H., Lunk A., Biocompatibility of TiN preclinical and clinical investigations, *Materials Science and Engineering*, **A139**, pp. 58-60 (1991).
- [Bia96] Bianco P.D., Ducheyne P., Cuckler J.M., Determination of *in vivo* titanium release from a non-articulating commercially pure titanium implant, *Medical applications of titanium and its alloys: The material and biological issues*, ASTM STP 1272, Brown S.A. and Lemons J.E. Eds., ISBN 0-8031-2010-9, American Society for Testing and Materials, Ann Harbor, USA, pp. 346-356 (1996).
- [Bia97] Bianco P.D., Ducheyne P., Cuckler J.M., Systemic titanium levels in rabbits with a titanium implant in the absence of wear, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **8**, pp. 525-529 (1997).
- [Bla92] Black J., *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility* (2nd edition), ISBN 0-8247-8439-1, Marcel Dekker Inc., Nueva York EE.UU., pp. 8 (1992).
- [Bor96] Bordji K., Jouzeau J.Y., Mainard D., Payan E., Netter P., Rie K.T., Stucky T., Hage-Ali M., Citocompatibilidad de Ti6Al4V and Ti5Al2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts, *Biomaterials*, **17**, pp. 929-940 (1996).
- [Bra93] Brauner H., Corrosion resistance and biocompatibility of physical vapour deposition coatings for dental applications, *Surface and coatings technology*, **62**, pp. 618-625 (1993).
- [Dor90] Dorr L.D., Bloebaum R., Emmanuel J., Meldrum R., Histologic, biochemical and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **261**, pp. 82-95 (1990).
- [Fer60] Ferguson A.B., Laing P.G., Hodge E.S., The ionization of metal implants in living tissue, *Journal of Bone and Joint Surgery*, **42A**, pp. 76-89 (1960).
- [Hea96] Healy K.E., Ducheyne P., Passive dissolution of titanium in biological environments, *Medical applications of titanium and its alloys: The material and biological issues*, ASTM STP 1272, Brown SA and Lemons JE Eds., ISBN 0-8031-2010-9, American Society for Testing and Materials, Ann Harbor, USA, pp. 179-187 (1996).
- [Jac96] Jacobs J.J., Skipor A.K., Black J., Patterson L.M., Paprosky P., Galante J.O., A 3-year prospective study of serum titanium levels in patients with primary total hip replacements, *Medical applications of titanium and its alloys: The material and biological issues*, ASTM STP 1272, Brown S.A. and Lemons J.E. Eds., ISBN 0-8031-2010-9, American Society for Testing and Materials, Ann Harbor, USA, pp. 400-408 (1996).
- [Kel96] Keller J.C., Stanford C.M., Draughn R.D., Wightman J.P., *In vitro* osteoblast responses to cp Ti and Ti6Al4V alloy, *Medical applications of titanium and its alloys: The material and biological issues*, ASTM STP 1272, Brown S.A. and Lemons J.E. Eds., ISBN 0-8031-2010-9, American Society for Testing and Materials, Ann Harbor, USA, pp. 319-332 (1996).
- [Kir98] Kirkpatrick C.J., Bittinger F., Wagner M., Köhler H., van Kooten T.G., Klein C.L., Otto M., Current trends in biocompatibility testing, *Proceedings of the Institute of Mechanical Engineers part H*, **212**, pp. 75-84 (1998).
- [Kov96] Kovacs P., Davidson J.A., Chemical and electrochemical aspects of the biocompatibility of titanium and its alloys, *Medical applications of titanium and its alloys: The material and biological issues*, ASTM STP 1272, Brown S.A. and Lemons J.E. Eds., ISBN 0-8031-2010-9, American Society for Testing and Materials, Ann Harbor, USA, pp. 163-178 (1996).

- [Kub99] Kubo T., Sawada K., Hirakawa K., Shimizu C., Takamatsu T., Histiocyte reaction in rabbit femurs to UHMWPE, metal and ceramic particles in different sizes, *Journal of Biomedical Materials Research*, **45** (4), pp. 363-369 (1999).
- [Lai67] Laing P.G., Ferguson A.B., Hodge E.S., Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants, *Journal of Biomedical Materials Research*, **1**, pp. 135-149 (1967).
- [Lug91] Lugowski S.J., Smith D.C., McHugh A.D., Van Loon J.C., Release of metal ions from dental implant materials in vivo: determination of Al, Co, Cr, Mo, Ni, V, and Ti in organ tissue, *Journal of Biomedical Materials Research*, **25**, pp. 1443-1458 (1991).
- [Mer96] Merritt K., Brown S.A., Distribution of titanium and vanadium salts and corrosion products in cells fluids and organs *in vivo* and in cell culture *in vitro*, *Medical applications of titanium and its alloys: The material and biological issues*, ASTM STP 1272, Brown S.A. and Lemons J.E. Eds., ISBN 0-8031-2010-9, American Society for Testing and Materials, Ann Harbor, USA, pp. 357-367 (1996).
- [Mir82] Mirra J.M., Marder R.A., Amstutz H.C., The pathology of failed total hip arthroplasty, *Clinical Orthopaedics*, **170**, pp. 175 (1982).
- [NIH85] NIH Publication #86-23 Rev. 1985, *Guide for the care and use of laboratory animals* (1985).
- [Pap95] Pappas M.J., Makris G., Buechel F.F., Titanium nitride ceramic film against polyethylene, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **317**, pp. 64-70 (1995).
- [She99] Shettlemore M.G., Bundy K.J., Toxicity measurement of orthopaedic implant alloy degradation products using a bioluminescent bacterial assay, *Journal of Biomedical Materials research*, **45** (4), pp. 395-403 (1999).
- [Ste80] Steinmann S.G., Corrosion of surgical implants - *in vivo* and *in vitro* tests, *Evaluation of Biomaterials*, Winter G.D., Leray J.L., de Groot K. eds., John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 1-34 (1980).
- [Wil81] Williams D.F., *Toxicology of implanted metals, Fundamental aspects of biocompatibility*, Williams D.F. ed. CRC Press Inc, Boca Raton, USA, pp. 45-61 (1981).
- [Wil87] Williams D.F., Definitions in Biomaterials: Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, UK, ed. Elsevier, Amsterdam (1987)
- [Woo84] Woodman J.L., Jacobs J.J., Galante J.O., Urban R.M., Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons: a long-term study, *Journal of Orthopaedic Research*, **1** (4), pp. 421-430 (1984).